

ELECTRONENMICROSCOPISCH ONDERZOEK
OVER DE MORPHOLOGIE
EN DE WIJZE VAN VERMEERDERING VAN
MYCOBACTERIËN

Leiden
1956

STANFORD UNIVERSITY MEDICAL
LIBRARY
SAN FRANCISCO

J. G. A. BORGHANS

ELECTRONENMICROSCOPISCH ONDERZOEK OVER DE
MORPHOLOGIE EN DE WIJZE VAN VERMEERDERING
VAN MYCOBACTERIËN

Uit de Afdeling voor Bacteriologie en Experimentele Pathologie van het Nederlands
Instituut voor Praeventieve Geneeskunde te Leiden.

Uitgegeven met steun van de Koninklijke Nederlandse Centrale Vereniging tot
bestrijding der tuberculose.

ELECTRONENMICROSCOPISCH ONDERZOEK
OVER DE MORPHOLOGIE
EN DE WIJZE VAN VERMEERDERING VAN
MYCOBACTERIËN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJSUNIVERSITEIT
TE LEIDEN OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS
DR A. E. VAN ARKEL, HOOGLERAAR IN DE FACUL-
TEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE, TEGEN DE
BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEES-
KUNDE TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 27 JUNI 1956
TE 16 UUR

DOOR

JOHAN GERARD ANDRÉ BORGHANS

GEBOREN TE HOENSBROEK IN 1926

H. E. STENFERT KROESE N.V. - LEIDEN

PROMOTOR: PROFESSOR DR. J. D. VERLINDE

*Aan mijn ouders,
aan mijn vrouw*

INHOUD

	Blz.
I Inleiding	I
II Materiaal en methodiek	7
III Vorm en structuur van Mycobacteriën	11
IV Kernkleuring bij Mycobacteriën	23
V De wijze van vermeerdering van Mycobacteriën in cultures	37
VI De wijze van vermeerdering van Mycobacteriën in weefsels	64
VII Slotbeschouwing	73
VIII Samenvatting	77
IX Summary	80
Literatuur	83

I

INLEIDING

Sedert de ontdekking van de tuberkelbacterie door KOCH (1882), is de betekenis van de structuur en het pleomorphisme van deze bacterie — vooral in verband met de wijze van vermeerdering — onderwerp geweest van onderzoek en controverse. Hoewel de opvatting, dat tuberkelbacteriën zich slechts door dwarsdeling vermeerderen, steeds meer veld won, bleef de controverse in wezen onbeslist en kan men ook uit de recentere literatuur nog vele andere zienswijzen vernemen.

Omdat deze opvattingen — althans voor een groot gedeelte — reeds in oudere beschrijvingen gevonden kunnen worden, volgt hier een overzicht van de belangrijkste van deze vroegere bevindingen. Voor een uitgebreider overzicht verwijzen wij naar OOMEN (1932) en HU (1936).

De hypothesen, volgens welke de tuberkelbacterie een „ontwikkelingscyclus” doormaakt, zijn gebaseerd op het voorkomen van andere vormen dan gelijkmatig zuurvast gekleurde staven in cultures en weefsels (zoals niet-zuurvaste staven en draden, zuurvaste en niet-zuurvaste korrels en gekorrelde, geheel of gedeeltelijk zuurvaste staven).

De opvattingen, die ten aanzien van de wijze van vermeerdering van tuberkelbacteriën bestonden of bestaan, zouden in een van de volgende categorieën ondergebracht kunnen worden:

- 1) de tuberkelbacterie zou een bepaald stadium zijn in de ontwikkelingscyclus van een organisme van hogere orde;
- 2) de tuberkelbacterie zou uiteenvallen in een aantal kleinere vormen of kleinere vormen zouden zich van het bacterielichaam vrijmaken, waarna deze kleinere elementen zich weer zouden ontwikkelen tot zuurvaste staven;
- 3) de vermeerdering zou plaats hebben door dwarsdeling (en misschien door afsplitsing van zijtakken).

ad 1) Nadat NOCARD en ROUX (1887) op de aanwezigheid van vertakte vormen in cultures van tuberkelbacteriën gewezen hadden, welke vertakkingen aan de uiteinden kolfvormig verdikt bleken te zijn, vond deze opvatting veel steun. Op grond van soortgelijke waarnemingen nam METSCHNIKOFF (1888) aan, dat de staaftvorm een stadium zou vertegenwoordigen in de ontwikkelingscyclus van een hoger organisme, reden waarom hij de naam „*Sclerothrix kochii*” voorstelde. Een zelfde

opvatting werd o.a. door COPPEN-JONES (1895) en LUBARSCH (1899) beschreven. Dezen meenden, dat de tuberkelbacterie zou behoren tot de familie der Actinomyceten. Nu heeft men deze hypothese verlaten en wordt vrijwel algemeen het classificatieschema van WAKSMAN en HENRICI (v. SKINNER c.s. 1947) aanvaard, in welk schema de Mycobacteriën als aparte familie van de Actinomycetales zijn opgenomen.

ad 2) Reeds MALASSEZ en VIGNAL (1883) vonden in sommige tuberculeuze haarden geen bacteriën, doch slechts kleine korrels, a.h.w. ingebed in een amorphe en lichter gekleurde massa. Zij betwijfelden of deze korrels in bacteriën kunnen overgaan en kwamen tot de conclusie, dat er twee klinisch niet te onderscheiden vormen van tuberculose bestaan, waarvan de een zou berusten op een besmetting met tuberkelbacteriën en de andere, de „zoögløeale”, veroorzaakt zou worden door kleine korrels.

MUCH (1908) beschreef de Gram-positieve en zuurvaste korrels die in tuberkelbacteriën kunnen voorkomen. In sommige tuberculeuze afwijkingen vond ook hij geen bacteriën, doch slechts vele niet-zuurvaste korrels. Uit deze gegevens meende hij te kunnen concluderen, dat de korrels een bepaald (pathogeen) stadium in de ontwikkeling van de tuberkelbacterie vertegenwoordigen.

FONTÈS (1910, v. 1926) poogde deze hypothese van MUCH te bewijzen, door korrels en bacteriën van elkaar te scheiden. Na filtratie van tuberculeuze etter kon hij door insputing van deze filtraten bij caviae tuberculose veroorzaken. Lange tijd werd aan zijn ontdekking geen aandacht geschonken, totdat het onderzoek van VAUDREMER (1923) deze resultaten bevestigde. Volgens VAUDREMER zouden het echter niet de korrels van MUCH zijn, doch zuurvaste korrels, die de filters passeren, daarna gekweekt kunnen worden op kunstmatige voedingsbodems en de oorzaak zijn van de tuberculose der proefdieren (VAUDREMER 1924, VAUDREMER en HAUDUROY 1923).

Ook VALTIS (1924) kon door insputing van filtraten van sputa en tuberculeuze pus bij caviae tuberculose veroorzaken, doch na enting van deze filtraten op kunstmatige voedingsbodems kon hij nooit zuurvaste staven kweken. Deze ontdekking was, met de bevinding van CALMETTE en VALTIS (1926), die in preparaten van dergelijke filtraten nooit korrels konden vinden, de reden, dat niet de zichtbare korrels maar andere elementen als filtreerbare vormen aangezien werden. Volgens CALMETTE en VALTIS zouden uit deze korrels ontstane ultravirussen als de filtreerbare elementen beschouwd moeten worden. Deze virussen zouden slechts geïsoleerd kunnen worden door insputing van de filtraten bij caviae, bij welke dieren zij de oorzaak zouden zijn van een „atypische” en goedaardig verlopende tuberculose (die zich o.a. zou uiten als hyperplasie der lymphklieren). Door passage via caviae zou het virus virulenter worden en tenslotte de

karacteristieke tuberculeuze afwijkingen veroorzaken, waarin de zuur-vaste staven te vinden zouden zijn.

ARLOING en DUFOURT (1926) wezen op het nut van de reactie op tuberculine, die positief zou uitvallen bij met filtraten besmette caviae, zelfs als bij aldus besmette caviae geen afwijkingen gevonden zouden worden.

Klinisch, dacht men, zouden deze resultaten ook toegepast kunnen worden. CALMETTE c.s. (1926) meenden dat deze filtreerbare vormen de placenta kunnen passeren en zo het kind kunnen infecteren, want uit organen van doodgeboren kinderen, wier moeders aan tuberculose leden, konden zij door inspuiting bij caviae tuberkelbacteriën isoleren, hoewel deze organen, voorzover zij door middel van Ziehl-Neelsen preparaten konden nagaan, geen tuberkelbacteriën bevatten. ARLOING en DUFOURT (1925) meenden deze gang van zaken in experimenten op gravide caviae verwezenlijkt te hebben.

Een aantal, minder of meer met tuberculose in betrekking staande, afwijkingen en ziekten (zoals erythema nodosum, tuberculiden en sarcoïden) beschouwde CALMETTE (1930) als veroorzaakt door filtreerbare vormen.

Een ander belangrijk aspect van de virushypothese zou de „type-instabiliteit” van het virus zijn. VALTIS en VAN DEINSE (1932) konden na herhaalde overentingen en dierproeven het aviaire karakter aantonen van stammen, die geïsoleerd waren uit caviae, besmet met filtraten van bovine tuberkelbacteriecultures.

Een groot aantal onderzoekers kon deze resultaten in soortgelijke experimenten of op andere wijze reproduceren, een zeker even groot aantal kon geen aanwijzingen vinden voor het bestaan van filtreerbare vormen van tuberkelbacteriën in cultures of weefsels. Wij zullen ons hier beperken tot de vermelding van de negatieve resultaten van de onderzoeken van BIJL (1928), RUYS (1928), VAN DER LEE (1928), BOENTARAN MARTOADMODO (1931), OOMEN (1932), SCHLEMPER en TEN THIJE (1939). De resultaten, die de voorstanders van de virushypothese verkregen, werden door de tegenstanders toegeschreven aan lekkage van de filters (VAN DER LEE zag bij caviae tuberculeuze afwijkingen na inspuiting van 2 resp. 10 bacteriën; BIJL zag dat inspuiting van 5 à 10 bacteriën bij caviae tuberculose tengevolge had) of aan spontane besmetting - vooral wanneer verscheidene passages verricht werden. BIJL en RUYS wezen verder op de mogelijkheid, dat toxinen en antigenen in de filtraten aanwezig zijn, zodat de „atypische” afwijkingen resp. de reactie op tuberculine verklaard zouden kunnen worden door de inspuiting van grote hoeveelheden filtraat.

NÈGRE en BRETEY (1953) toonden aan, dat tuberkelbacteriën uit zeer jonge cultures Chamberland L 3 kaarsen bij hoge druk kunnen passeren (— 50 cm Hg). Deze bacteriën zouden weinig virulent zijn en

na inspuiting bij caviae slechts abortieve tuberculose veroorzaken.

WERNER (1954) wees op de grote elasticiteit van de bacteriewand in jonge cultures, waardoor de bacteriën gemakkelijk vervormd zouden kunnen worden. Zodoende zouden tuberkelbacteriën de filters kunnen passeren. Daarentegen meende KLIENBERGER-NOBEL (1951) het voorkomen van filtreerbare vormen te kunnen verklaren, door de aanwezigheid van L-vormen in cultures van tuberkelbacteriën aan te nemen.

Ook HAUDUROY en TANNER (1954) meenden, dat — onder bepaalde omstandigheden — filtreerbare vormen in cultures van Mycobacteriën kunnen voorkomen. Zij filtreerden mengsels van saprophyten en hun bacteriophagen. Door herhaald passeren van de filtraten op kunstmatige voedingsbodems, slaagden zij er in, cultures van de oorspronkelijke saprophyt te verkrijgen.

KAHN (1929) volgde de groei in microcultures en zag (behalve dwarsdeling) enkele malen een meer gecompliceerde wijze van vermeerdering, waarbij staven uiteenvielen in drie of meer eivormige korrels. Deze korrels deelden zich, waarna fragmentatie van de nieuw ontstane korreltjes plaats had, zodat groepjes van microscopisch bijna niet meer zichtbare partikeltjes ontstonden. Hieruit groeiden fijne staafjes, die zich later ontwikkelden tot bacteriën.

Volgens HU (1936), die eveneens de groei in microcultures naging, vermeerderd de tuberkelbacterie zich in de regel door dwarsdeling. Korrels zouden ofwel degenereren en uiteenvallen, ofwel uitgroeien tot fijne staafjes.

BRIEGER en FELL (1946) namen waar, dat de bacteriën van aviaire stammen dadelijk na overenting langer werden. Deze lange staven vermeerderden zich door dwarsdeling gedurende een bepaalde tijd (aan sommige staven ontstonden zijtakken); hierna vielen deze lange staven ieder in verscheidene korte staafjes uiteen, die zich weer vermeerderden door dwarsdeling. Eerst na overenting zou dezelfde cyclus herhaald worden.

Ad 3) Een groot aantal onderzoekers heeft na de publicatie van KAHN de groei van microcultures van verschillende types onderzocht. GARDNER (1929), OERSKOV (1932), JENSEN (1934), WYCKOFF (1934), MC CARTER en HASTINGS (1935), WYCKOFF en SMITHBURNE (1936), VERA en RETTGER (1940) en later ROTH (1949) en ESPERSEN (1949) (beiden met het phasecontrastmicroscop) konden geen van allen de resultaten van KAHN reproduceren en zagen allen slechts vermeerdering door dwarsdeling. Sommigen namen ook groei door vertakking waar.

JENSEN (1934) beschreef twee mogelijkheden voor het tot stand komen van de karakteristieke ligging der tuberkelbacteriën:

1) de „snapping growth”, waarbij de twee dochtercellen na deling een hoek gaan vormen, welke steeds scherper wordt, totdat de bac-

teriën tenslotte parallel liggen, 2) de „slipping growth”, waarbij de einden van de staven buigen en de bacteriën langs elkaar glijden. Beide vormen van groei werden ook door ROTH waargenomen (1949).

OERSKOV (1932) zag het phenomeen, dat KAHN beschreven had, na enting van gedode tuberkelbacteriën. Hij meende, dat dit verschijnsel het gevolg was van uitkristalliseren en degeneratie.

Alleen GARDNER (1929) en MC CARTER en HASTINGS (1935) namen geen groei door vertakking waar. De laatsten schreven de waarnemingen van anderen toe aan het gebruik van te kleine vergroting en betwijfelden, of bij Mycobacteriën wel groei door vertakking kon plaats hebben. Daarentegen zagen BRIEGER en FELL (1946), behalve dwarsdeling en de reeds beschreven fragmentatie, regelmatig vertakkingen ontstaan in vele cultures van verscheidene aviaire stammen. Bij enkele stammen zagen zij zelfs secundaire en tertiaire zijtakken. Na zekere tijd werden deze mycelia voor een gedeelte minder lichtbrekend, wat de schrijvers als een uiting van beginnende lysis beschouwden; werden deze microcultures volgens Ziehl-Neelsen gekleurd, dan waren overeenkomstige delen van het mycelium niet zuurvast. Na overenting van cultures, bestaande uit staven en vertakkingen, groeiden en vermeerderden zich slechts de staven. In andere cultures, eveneens van aviaire stammen, vonden BRIEGER en FELL (1946) slechts pseudomycelia, die bij kleine vergroting inderdaad de indruk wekten, uit echte vertakkingen te bestaan.

Het pleomorphisme in oudere cultures verklaarden o.a. WYCKOFF (1934) en MC CARTER en HASTINGS (1935) ten dele, door aan te nemen dat de lengtegroei eerder ophoudt dan de dwarsdeling, zodat deze cultures tenslotte geheel of ten dele bestaan uit coccoïde staafjes.

Een jaar, nadat VON BORRIES en RUSKA (1939) de eerste electronen-microscopische foto van tuberkelbacteriën gepubliceerd hadden, die — met andere foto's — slechts tot doel had, de bruikbaarheid van het electronenmicroscop aan te tonen voor verschillende doeleinden, beschreven LEMBKE c.s. (1940) de resultaten van hun electronen-microscopisch onderzoek van *M. avium*. Als eersten wezen zij op het voorkomen van voor electronen ondoordringbare¹, ronde of ovale korrels, meestal aan de polen, doch ook wel bij het centrum gelegen. Deze korrels waren 100—250 m μ groot en werden door intensieve blootstelling aan electronen beschadigd. Kleinere (tot 50 m μ grote)

¹ Het begrip: „voor electronen ondoordringbaar” zal in navolging van de betreffende Engelse literatuur „dicht” genoemd worden, het tegengestelde begrip zal als „transparant” betiteld worden.

Hierbij vermelden wij tevens, dat wij gebieden van gelijkmatige dichtheid: „homogeen”, en gebieden van wisselende, ongelijkmatig verdeelde dichtheid, waarbij onscherp begrensde, dichtere en transparantere plekken naast elkaar voorkomen: „gedifferentieerd” zullen noemen.

zgn. „microgranula” konden volgens hen door het cytoplasma verspreid liggend voorkomen.

Deze zouden in (eveneens door LEMBKE c.s. beschreven) vacuolen ontstaan, en wel door synthese van het hierin aanwezige reserve-materiaal. Daarna zouden deze microgranula „aangroeien” tot grote korrels.

Daarna zijn tuberkelbacteriën herhaaldelijk met het electronen-microscop onderzocht. Onderwerp van deze onderzoeken waren 1) de wijze van vermeerdering, 2) de structuur van de tuberkelbacterie en 3) de veranderingen, die deze structuur ondergaat onder invloed van antibiotica en chemotherapeutica.

De verandering van de structuur van de tuberkelbacterie door deze geneesmiddelen is wel herhaaldelijk onderzocht (MORTISCHNIG en RUZICZKA 1949, RUZICZKA 1951, RUZICZKA en ORTH 1950, TROCH 1943), maar deze wijze van onderzoek blijkt nog weinig gefundeerd te zijn en valt buiten het bestek van dit geschrift.

Aanleiding tot dit onderzoek was de bevinding van LIE (1955), dat hij enkele dagen na inspuiting van tuberkelbacteriën in de dooierzak van bebroede kippenembryo's ophopingen van zuurvaste en niet-zuurvaste korrels vond, evenals een aantal recente publicaties (voor het merendeel gebaseerd op onderzoeken met het electronen-microscop), waarin ernstig rekening werd gehouden met de mogelijkheid, dat de tuberkelbacteriën zich behalve door dwarsdeling ook op andere wijze kunnen vermeerderen.

Verwacht mocht worden, dat een onderzoek met het electronen-microscop, door het groter oplossend vermogen van dit instrument, een bijdrage tot de oplossing van dit probleem zou kunnen leveren en nieuw licht zou werpen op de structuur van de tuberkelbacterie.

Achtereenvolgens zullen de methodes, volgens welke de electronen-microscopisch te onderzoeken preparaten werden gemaakt, de vorm en de structuur van de Mycobacteriën besproken worden.

Bij electronenmicroscopisch onderzoek bleek, dat geen enkel vormsel of structuurelement met zekerheid als kern of kernaequivalent kon worden aangeduid. De beschrijving van de pogingen die gedaan werden, deze kernstructuur met licht- en electronenmicroscop te benaderen vindt een plaats in het 4e hoofdstuk.

Daarna worden de veranderingen in de vorm der Mycobacteriën tijdens de groei der onderzochte cultures nagegaan. De resultaten van het onderzoek van deze cultures en van enkele suspensies van met tuberkelbacteriën besmette weefsels zullen ten slotte met enige dieren kweekproeven geverifieerd worden.

II

MATERIAAL EN METHODIEK

MATERIAAL

Onderzocht werden cultures van de humane stammen H₃₇Rv, SE, BE, (de laatste twee geïsoleerd uit sputum van lijders aan long-tuberculose) en R₄₀₈ (gekweekt uit menstruatiebloed) en cultures van *M. avium* (stam Av) en *M. phlei*.

Als voedingsbodems werden vooral gebruikt: de voedingsbodem van Loewenstein, de dooierzak van bebroede kippenembryo's en Dubos' agar. Enkele malen werden cultures in het medium van FRIEDMANN (1954) en Dubos' vloeibaar medium onderzocht.

Vrijwel alle electronenmicroscopisch te onderzoeken preparaten werden gemaakt op zilveren objectdragers, bedekt met „formvar“-vliezen.¹ Koolvliezen werden slechts voor bijzonder onderzoek gebruikt (bijv. hydrolyse in N/1 zoutzuur bij 60°), wanneer formvar-vliezen niet tegen de behandeling bestand waren.

Het onderzoek geschiedde met een Philips' electronenmicroscop (type E.M. 100).²

METHODIEK

Bespreking

In het begin van het electronenmicroscopisch onderzoek werden preparaten van bacteriecultures gemaakt door de cultuur te suspenderen en van de suspensie een druppel op de objectdrager te leggen. Deze druppel liet men drogen, waarna het preparaat onderzocht kon worden. Drogen van een suspensie in physiologische zoutoplossing had echter grove beschadigingen ten gevolge, door de steeds groter wordende zoutconcentratie. (HILLIER 1950, MØLLER en BIRCH-ANDERSEN 1951). Ook drogen van een suspensie in gedestilleerd water veroorzaakte artefacten, zoals vlakker worden en „opheldering“ van de bacteriën. (HILLIER 1950, KELLENBERGER 1952).

De beschadigingen die door deze werkwijzen ontstonden, werden slechts onderzocht bij niet zuurvaste bacteriën (zoals *Salmonella* en *E. coli*).

Weliswaar bleek, (MØLLER en BIRCH-ANDERSEN 1951) dat de arte-

¹ Polyvinyl formal.

² De waarnemingen werden gedaan in het laboratorium voor Electronenmicroscopie van de Rijksuniversiteit te Leiden.

facten, ontstaan door drogen van de suspensies in physiologische zoutoplossing, bijv. de zeer sterke plasmolyse, ten dele konden worden opgeheven door spoelen van het preparaat in gedestilleerd water (zolang dit preparaat nog niet gefixeerd was), maar omdat men inzag dat op deze wijze weinig gefundeerde conclusies zouden gevormd worden ten aanzien van de structuur van bacteriën, ging men zoeken naar prepareertechnieken, die het ontstaan van artefacten tot een minimum zouden beperken.

Zo kwam men tot het gebruik van een van de volgende werkwijzen:

1) Over de voedingsbodem wordt de formvar- of collodionoplossing gegoten. Na verdamping van het oplosmiddel vormt zich een vlies, waarop de bacteriën, gesuspenseerd in gedestilleerd water, geënt worden. Nadat deze cultuur gedurende de gewenste tijd bebroed is, worden stukjes voedingsbodem uitgesneden en gefixeerd, waarna het vlies met de cultuur van de voedingsbodem gescheiden wordt door spoelen in gedestilleerd water. De stukjes vlies worden daarna opgevangen op de objectdragers. (HILLIER c.s. 1948, KELLENBERGER 1954; door KNAYSI c.s. 1950 voor onderzoek van *M. avium* gebruikt).

2) Het vlies wordt gevormd op een reeds beënte voedingsbodem. De overige handelingen zijn dezelfde als onder 1). (HILLIER 1948). Deze werkwijze veroorzaakt echter waarschijnlijk artefacten door de werking van het oplosmiddel (meestal chloroform).

3) De bacteriën kunnen op de objectdragers gekweekt worden. Daarvoor is vereist, dat het lipje aan de met vlies bedekte zijde van de objectdrager 90° naar buiten gebogen wordt. Daarna wordt de objectdrager, met het vlies naar de voedingsbodem gekeerd, op het medium gelegd. Van een suspensie van de te onderzoeken bacteriën in gedestilleerd water wordt een kleine druppel op de objectdrager gelegd.

Deze werkwijze kan gebruikt worden voor onderzoek van cultures op vaste (VALENTINE c.s. 1954) en op vloeibare media (BRIEGER en COSSLETT 1948, 1949, door de objectdrager op filtreerpapier te leggen, dat doordrenkt is met vloeibare voedingsbodem).

4) Uit vloeibare media kunnen de bacteriën dadelijk op de objectdrager gecentrifugeerd worden (KELLENBERGER 1952). Deze methode biedt geen wezenlijk voordeel. Daarenboven blijkt, dat zij bij onderzoek van pathogene microorganismen gevaar oplevert, zodat zij door vrijwel niemand gebruikt wordt (WERNER 1951).

In wezen is de onder 3) genoemde methode slechts een wijziging van 1).

De gebruikte methodes

Bij onderzoek van cultures van *M. avium* en H37Rv, die op objectdragers gekweekt werden (op filtreerpapier dat met vloeibaar Dubos' medium was doordrenkt) bleek dat in vele preparaten geen groei

waar te nemen was, waarschijnlijk door ongunstige osmotische verhoudingen. Ook werden vele verontreinigingen uit het medium gevonden.

De meest geschikte methode leek ons een wijziging van de onder 2) genoemde „pseudoreplica methode” van HILLIER. Het aan de met vlies bedekte zijde van de objectdrager opstaande lipje werd 90° naar buiten gebogen. De objectdragers werden gesteriliseerd in 1 % osmiumtetroxydedamp of in 10 % formalinedamp. Daarna werden de objectdragers, met het vlies naar de voedingsbodem gekeerd (Loewenstein of Dubos), op de cultuur gedrukt. De bacteriën hechtten zich aan het vlies en lagen hierop in dezelfde rangschikking als op de voedingsbodem.

Deze afdrukpreparaten werden vervolgens gefixeerd in 1 % osmiumtetroxydedamp, gespoeld in gedestilleerd water en gedroogd bij kamertemperatuur. Bij vele bacteriën in verscheidene preparaten kwam dan lichte plasmolyse voor, een artefact dat overigens niet stoorde en voor de beoordeling van delingsfiguren zelfs gunstig was. Minder plasmolyse kwam voor, als de preparaten eerst werden gedroogd bij 60° en daarna gefixeerd. Al of niet spoelen met gedestilleerd water bleek geen invloed te hebben op de structuur.

Aangezien met deze techniek weinig of geen verontreinigingen te zien en de afzonderlijke bacteriën goed te beoordelen waren, werd deze methode het meest gebruikt en zal de bespreking van de structuur der bacteriën vooral betrekking hebben op de door middel van deze afdrukpreparaten onderzochte cultures.

Ook werden enkele cultures op de voedingsbodems van Loewenstein en Dubos op de oude wijze onderzocht. Van de cultures op deze voedingsbodems werden enkele entnaaldoogjes afgestreken en gesuspendeerd in physiologische zoutoplossing. Van deze suspensies werden kleine druppels op de objectdragers gelegd. Deze preparaten werden gedurende drie minuten in 1 % osmiumtetroxydedamp gefixeerd, gedroogd, gespoeld in gedestilleerd water (om ondoordringbare zoutkristallen te verwijderen) en wederom gedroogd.

Voor het onderzoek van cultures in de dooierzak van bebroede kippenembryo's, Friedmann's medium en Dubos' vloeibaar medium, evenals van orgaansuspensies, waren wij geheel op de oude werkwijze aangewezen.

De dooiermassa werd volgens LIE (1955) gehomogeniseerd met 2 % teepoloplossing, gezuiverd door éénmaal wassen met 1,5 % natronloogoplossing en verscheidene malen gewassen met physiologische zoutoplossing. In enkele reeksen van dooierzakcultures werden dan van het sediment preparaten gemaakt, zoals eerder beschreven werd voor de suspensies van cultures op vaste voedingsbodems. In andere reeksen werd het sediment nog éénmaal gewassen met 0,1 % osmiumtetroxydeoplossing en éénmaal met gedestilleerd water. Daarna werden

de preparaten gemaakt door kleine druppels op de objectdragers te leggen en deze te drogen bij 60° C.

Cultures in Friedmann's medium en Dubos' vloeibaar medium werden onderzocht door gedeelten van het medium, al of niet gemengd met physiologische zoutoplossing, te centrifugeren en het sediment te resuspenderen in physiologische zoutoplossing. Van deze suspensie werden de preparaten gemaakt op de reeds beschreven wijze.

Deze methodes zullen ter wille van de overzichtelijkheid meer gedetailleerd besproken worden bij de beschrijving van de ontwikkeling van de verschillende cultures en het onderzoek der weefselsuspensies.

De werkwijzen, die gebruikt werden bij de kernkleuring, zullen in het desbetreffende hoofdstuk beschreven worden.

Van alle electronenmicroscopisch onderzochte suspensies werden preparaten ter kleuring volgens Ziehl-Neelsen gemaakt. Van de cultures op vaste voedingsbodems, waarvan wij afdrukpreparaten voor electronenmicroscopisch onderzoek maakten, werden geen Ziehl-Neelsen preparaten vervaardigd. Van de stam SE en van *M. avium* werden overeenkomstige cultures aangelegd op Dubos' agar. Uit deze voedingsbodems werden stukjes gesneden, die gedurende 3 minuten in 1 % osmiumtetroxydedamp gefixeerd werden. Vervolgens werden deze stukjes gedept op objectglazen, waarna de preparaten volgens Ziehl-Neelsen werden gekleurd.

Enkele electronenmicroscopisch te onderzoeken preparaten werden met palladium geschaduwd.¹

¹ Metalen met laag smeltpunt worden onder een kleine hoek over de preparaten verstoven. Zodoende worden de vliezen met een fijn laagje metaal bedekt. Op alle oneffenheden komt een dikker laagje metaal te liggen. Achter deze oneffenheden is dan telkens een klein stukje vlies niet met metaal bedekt. De grootte van dit stukje is afhankelijk van de hoogte van het obstakel en de hoek waaronder het metaal verstoven is.

Voor een beschrijving van de werking van het electronenmicroscop met toebehoren verwijzen wij naar R. W. G. WYCKOFF „Electronmicroscopy, technique and applications”, 1949 Interscience Publ. Inc. N.Y. en W. G. BRAAMS, Verslagen der Tuberculose-studiecommissie 1956 (ter perse).

III

VORM EN STRUCTUUR DER BACTERIËN

Vorm en lengte

Vorm. In de cultures van alle onderzochte stammen deden de bacteriën zich voor als staven met afgeronde polen, althans wanneer zij geïsoleerd lagen. In de ketens die door humane stammen gevormd werden, lagen de bacteriën zo dicht op elkaar dat zij zich, wat hun vorm betreft, aan de beschikbare ruimte moesten aanpassen. De polen waren dan hoekig en de bacteriën onregelmatig van vorm. Duidelijk was dit te zien als door drogen of mechanisch trauma scheuren ontstonden, welke dan langs de begrenzingen van de bacteriën in de ketens liepen.

In oudere cultures waren de bacteriën ovaal tot bolvormig of peervormig.

Lengte. Het is moeilijk voor de lengte van de Mycobacteriën bepaalde waarden aan te geven. Deze lengte varieerde namelijk sterk. Wel is er samenhang tussen de leeftijd van de cultuur en de lengte van de bacteriën, met dien verstande dat, waarschijnlijk door afnemende groei in lengte terwijl de deling voortgaat, de bacteriën kleiner worden en ovale vormen aannemen, naarmate de cultuur ouder wordt.

Vooral bij *M. avium* en *M. phlei* kwam deze neiging vroeg tot uiting (op Dubos' agar bij *M. phlei* na 24—48 uur, bij *M. avium* na 6—9 dagen). Tenslotte bestonden deze cultures vrijwel alleen uit korte ovale vormen met een lengte die meestal rond of beneden $1\ \mu$ lag.

Bij de onderzochte humane stammen kwam deze neiging later of minder tot uiting (na 2—3 weken op Dubos' agar). Zelfs 4 maanden na enting op Dubos' agar en 6 maanden na enting op de voedingsbodem van Loewenstein vonden wij in de cultures van de verschillende humane stammen, vooral van H37Rv, nog verscheidene lange bacteriën.

Voorts bestond er verschil in lengte tussen bacteriën van dezelfde stam, gekweekt op verschillende media. Zo bleken bacteriën van de H37Rv stam langer te zijn, wanneer zij gekweekt werden in de dooierzak, dan in de cultures op Dubos' agar of in Friedmann's medium. Van de andere kant was er ook een groot verschil te zien in gemiddelde lengte tussen bacteriën van de H37Rv stam bij kweek op twee voedingsbodems van Loewenstein (het verschil bedroeg gemiddeld ongeveer $3\ \mu$).

Daarenboven varieerde de lengte van de bacteriën in één cultuur op een bepaald tijdstip soms sterk.

De verschillen in gemiddelde lengte van de bacteriën van diverse

humane stammen, gekweekt op één medium, waren over het algemeen slechts gering. De bacteriën van de stam H37Rv waren in het algemeen iets langer dan de bacteriën van de drie andere onderzochte humane stammen.

Sluit men de, vooral in oudere cultures van *M. avium* voorkomende, reuzenvormen uit, dan kan men zeggen dat de lengte varieert tussen 0,5 en 9 μ en meestal ligt tussen 1,5 en 4 μ .

Structuur van het cytoplasma

1) *Korrels*. De meest in het oog vallende vormsels in het cytoplasma waren ronde, ovale of onregelmatig gevormde, scherp begrensde, zeer dichte korrels, waarvan de afmetingen varieerden tussen 50 en 400 m μ , maar meestal ongeveer 200 m μ bedroegen.

Meestal bevatten de bacteriën twee korrels, die ieder in of bij de polen of, wat minder vaak voorkwam, dicht bij het centrum gelegen waren. Weinige bacteriën hadden slechts één korrel, die meestal aan een der polen lag, soms echter bij het centrum. Lange bacteriën, zoals in jonge cultures van *M. avium*, bevatten vaak meer dan twee korrels, waarvan er twee bij de polen en de andere verspreid in het cytoplasma lagen.

Wat het voorkomen van deze korrels betreft, was er een uitgesproken verschil tussen H37Rv en de andere onderzochte stammen. Bij H37Rv werden zij minder frequent gevonden en wanneer zij voorkwamen, waren zij kleiner dan bij de andere stammen.

Deze korrels zijn zeker niet specifiek voor *Mycobacterium*. Bij een groot aantal bacteriesoorten werden zij door verschillende onderzoekers gevonden (bijv. KÖNIG en WINKLER 1948: *C. diphtheriae*, *Spirillum volutans*, MUDD c.s. 1942: *Vibrionen* en *Spirochaeten*.) Al deze korrels hebben een kenmerkende eigenschap gemeen: terwijl voortzetting en intensivering van de bestraling met electronen nauwelijks schade toebrengt aan het cytoplasma, wordt het centrum van de korrels transparant; vervolgens ontstaat om dit transparante centrum een ringetje van gaatjes en tenslotte „smelt” het overgebleven skelet weg, zodat van de korrel slechts een smalle rand overblijft. Niet alle korrels bleken even gevoelig te zijn voor deze intensieve blootstelling aan electronen. Zelfs in één bacterie waren de korrels soms verschillend van gevoeligheid.

WESSEL (1942) wees reeds op dit verschil en onderscheidde, op grond hiervan, twee soorten van korrels. De gevoelige korrels zouden vluchtige lipoiden bevatten, de niet gevoelige zouden bestaan uit proteïnen. Aangezien deze laatste zó in de polen van vaak lege bacteriën lagen, dat zij buiten het bacteriële lichaam promineerden, sprak hij van „sporiden”, welke zich van het bacteriële lichaam zouden kunnen vrijmaken en zich op de wijze van sporen zouden kunnen ontwikkelen.

Enkele malen namen ook wij korrels in de bacteriepolen waar, die buiten het bacteriële lichaam promineerden en inderdaad niet veranderden door intensieve blootstelling aan electronen. Aangezien in vele andere bacteriën de korrels verschillend van gevoeligheid waren en meestal de minder gevoelige korrels door voortgezette of intensievere bestraling met electronen beschadigd konden worden, is het verschil in gevoeligheid waarschijnlijk slechts gradueel. Het was ons echter niet mogelijk, deze opvatting voor de — ook bij voortgezette of zeer intensieve blootstelling aan electronen — niet beschadigde korrels te toetsen, omdat bij langer intensiveren en grotere intensiteit van de bestraling de formvarvliezen scheurden.

Een andere kenmerkende eigenschap van de korrels is, dat zij bij lysis van de bacteriën niet aangetast worden. PENSO c.s. (1951) wezen reeds op het feit, dat bij lysis van *M. phlei* door bacteriophagen de korrels niet beschadigd worden en vrij komen te liggen. Niet zelden konden wij in cultures van de stammen SE, BE en R 408 vrije ronde korrels waarnemen, die door intensieve bestraling met electronen op dezelfde wijze veranderd werden als de korrels in de bacteriën. (Fig. 1.)

In lytische plekken, voorkomend in enkele 2 maanden oude cultures op Dubos' agar van de stammen BE en R408, werden ongeveer 400 m μ grote ronde korrels gevonden, elk verbonden aan een amorphe gelijkmatig dichte massa, waarin een enkele maal nog de bacterievorm te zien was. In overeenkomstige volgens Ziehl-Neelsen gekleurde preparaten werden grote lichtblauwe velden gevonden, waarin ophopingen van intensiever blauw gekleurde korrels voorkwamen. Enkele van de dichte korrels lieten zich op de reeds beschreven wijze veranderen. In sommige bacteriën, uit de rand van deze plekken, werden duidelijke en even grote korrels gezien. (Fig. 2, 3 en 4.)

Ook in jonge cultures van de stammen SE, BE en R408 werden niet zelden wazig of flardig begrensde, gelijkmatig dichte, gelyseerde bacteriën gevonden, waarin korrels voorkwamen.

Het is dus mogelijk dat de korrels bij lysis van de bacteriën vrijkomen.

Aard der korrels. Over de betekenis en aard der korrels bij Mycobacteriën zijn de meningen der verschillende onderzoekers verdeeld.

WESSEL (1942) meende, dat de korrels ophopingen van lipoiden, resp. proteïnen zouden zijn. Volgens ROSENBLATT c.s. (1942) zouden zij kernstructuren zijn. Later (1950) beschreven ook KNAYSI c.s. op grond van het vermogen tot deling, de korrels als kernaequivalenten. De opnamen die zij als argument voor hun hypothese publiceerden, zijn echter allerminst overtuigend.

MUDD c.s. (1951), MUDD en WINTERSCHIED (1952), WINTERSCHIED en MUDD (1953) zagen dat de o.a. met Janusgroen B als mitochondriën gekleurde gebiedjes in de bacteriën (ook in de tuberkel-

bacteriën) bij lichtmicroscopisch onderzoek, op dezelfde plaatsen als de electronenmicroscopisch waargenomen korrels lagen en beschouwden daarom de korrels als mitochondriën, een opvatting die later ook door BRIEGER c.s. (1954) aangenomen werd.

LEMBKE c.s. (1940) konden de korrels doen verdwijnen met behulp van aetherextractie en meenden, dat de korrels lipoidophopingen zouden zijn. WERNER (1951) kon, door alkalische oplossingen zeer lang te laten inwerken (gedurende uren), de korrels doen verdwijnen. Hij concludeerde hieruit, dat deze korrels behoren tot de groep der metachromatische korrels en opgebouwd zijn uit volutine.

KÖNIG en WINKLER (1948) waren in staat, de korrels van *C. diphtheriae* in zuren op te lossen. Bij de korrels van tuberkelbacteriën lukte dit eerst na voorafgaande aetherextractie. Ook zij namen aan, dat de korrels uit volutine bestaan.

RUSKA c.s. (1952) onderzochten een aantal suspensies van organische en anorganische stoffen met behulp van het electronenmicroscop. Geen van de onderzochte organische stoffen bleek zo dicht te zijn als de korrels van de tuberkelbacteriën. Van de onderzochte anorganische stoffen bleken slechts fosphaten en metaphosphaten op gelijke wijze als de korrels beschadigd te worden. Zij beschouwden de korrels als metaphosphaatafzettingen. SALL, DAVIS en MUDD (1955) gaven later — althans voor de korrels van diphtheriebacteriën — toe, dat deze bestaan uit metaphosphaten.

Verscheidene eigen bevindingen pleiten tegen de opvattingen, dat de korrels kernaequivalenten (of mitochondriën) zouden zijn. De korrels kwamen bij de onderzochte stammen niet in alle bacteriën voor en werden bij de stam H37Rv zeer onregelmatig en schaars gevonden. Wanneer de korrels kernaequivalenten zouden zijn, zouden — vooral in de phase van snelle groei van de cultuur — vele delingsfiguren gevonden moeten worden. Slechts een enkele maal werd een beeld gevonden, waaruit zou kunnen blijken, dat een korrel aan splijting onderhevig was.

Voorts bleken de korrels bij het ouder worden der cultures te verdwijnen. Bij *M. phlei* was dit reeds na 6 tot 24 uur, bij *M. avium* na 8—12 dagen het geval, hoewel bij *M. avium* ook na de gestelde tijd nog wel staafjes met zeer kleine korrels gevonden werden. In cultures van de humane stammen SE, BE en R408 werden 3—4 weken na enting nog vele duidelijke korrels gevonden. In enkele bacteriën waren de korrels in grote bollen veranderd, in andere bacteriën waren geen korrels of slechts resten te vinden: smalle randen, vaag begrensde dichtere plekken of fragmenten. (Fig. 5.)

Wel zijn er enkele argumenten die de overeenkomst met volutinekorrels bepleiten. De korrels kwamen namelijk vooral in jonge cultures voor en verdwenen door behandeling met zuren, minder met natron-

loog of kokend water en zij waren niet oplosbaar in aether.¹

Van 5 dagen oude cultures van de stammen Av en SE werden 18 afdrukpreparaten gemaakt. Drie hiervan dienden als contrôles. De overige werden gedurende $1\frac{1}{2}$ uur met aether geëxtraheerd. Met uitzondering van drie dezer, werden de preparaten (voor elke behandeling drie) gedurende 2 minuten met water van 95° , gedurende een halfuur met N/10 zoutzuur, N/10 natronloog of verzadigde pikrinezuuroplossing behandeld. Deze preparaten werden, terwijl ze nog nat waren — tegelijkertijd met de contrôle- en de met aether behandelde preparaten — gespoeld in gedestilleerd water, gedroogd bij 60° en gedurende 3 minuten in 1 % osmiumtetroxydedamp gefixeerd.

In de contrôlepreparaten werden korrels gevonden in vrijwel alle bacteriën. Deze kwamen ook voor in de met aether geëxtraheerde bacteriën en waren niet veranderd.

In de met pikrinezuur behandelde bacteriën kwamen bijna geen korrels meer voor. Zoutzuur bleek minder invloed te hebben en had enkele korrels niet aangetast. De meeste korrels verdwenen in hun geheel, van andere was nog een vaag begrensd dichter plekje of een randje over. In de met kokend water of natronloog behandelde preparaten waren nog vele korrels te vinden.

Dezelfde resultaten werden verkregen door afdrukpreparaten van 19 dagen oude cultures van de stam SE, en 4 dagen oude cultures van de stammen Av en SE op dezelfde wijze te behandelen. (Ook 2 % azijnzuur- en 13 % amandelzuuroplossing deden de korrels in de laatste preparaten verdwijnen).

De zuren bleken zonder voorafgaande extractie met aether minder op de korrels in te werken. Afdrukpreparaten van 16 dagen oude cultures van de stammen SE, BE en R408 werden gedurende een half uur met de reeds genoemde zuren of natronloog, of gedurende 2 minuten met bijna kokend gedestilleerd water behandeld. Slechts pikrinezuur en zoutzuur losten de korrels op en wel in de periferie der strengen en in geïsoleerd liggende bacteriën.

Op reeds gefixeerde en met het electronenmicroscop onderzochte bacteriën had zoutzuur geen invloed.

¹ Hoewel zeer uiteenlopende „oplosmiddelen” voor volutine worden opgegeven bestaat er volledige overeenstemming over zijn onoplosbaarheid in vetoplosmiddelen.

Volgens oudere onderzoekingen (GRIMME, MEYER, EISENBERG, geciteerd door KÖNIG en WINKLER) zou volutine uit de bacteriën verdwijnen door behandeling met oplossingen van zuren (of basen) en heet water.

KÖNIG en WINKLER konden de korrels doen verdwijnen met 2 % melkzuur-, 1 % azijnzuur-, verzadigde pikrinezuur- en N/10 zoutzuuroplossing.

Volgens McCLUNG (1950) verdwijnen de volutinekorrels door urenlange behandeling met water van 80° C, 2 % salpeterzuuroplossing en 0,02 % natriumbicarbonaatoplossing.

KINGMA BOLTJES (1952) geeft op dat volutinekorrels verdwijnen, wanneer de bacteriepreparaten even in bijna kokend water gehouden worden.

Deze waarnemingen spreken duidelijk voor de opvatting, dat de korrels volutinekorrels zijn, hoe men zich deze stof ook opgebouwd denkt.¹

Ontstaan der korrels. Volgens LEMBKE c.s. (1940) zouden de korrels ontstaan door synthese van het in de vacuolen aanwezige reserve-materiaal. Zij zouden in deze vacuolen als zeer kleine korrels gevormd worden en later aangroeien tot grote korrels.

Tijdens dit onderzoek was niet met zekerheid vast te stellen, hoe de korrels ontstaan. Wel werd duidelijk, dat dit niet (althans niet als vaste regel) in vacuolen plaats heeft, aangezien

1) vacuolen bij de humane stammen SE, BE en R408 niet vaak en korrels in vrijwel alle bacteriën voorkwamen,

2) korrels reeds in de bacteriën van *M. avium* voorkwamen voordat vacuolen gevonden werden,

3) en de korrels bij de genoemde stammen slechts zelden in de vacuolen gevonden werden.

Werden cultures van de humane stammen, die gedurende 4 maanden op de voedingsbodem van Loewenstein waren gekweekt en dan slechts weinig bacteriën met korrels bevatten, overgeënt, dan bezaten vele bacteriën reeds 24 of 48 uur later duidelijke en grote korrels. Bij overenting van *M. phlei* werden reeds 3 uur later in sommige bacteriën grote korrels gevonden. In 24 tot 48 uur oude cultures van *M. avium* werden staafjes met kleine korrels aangetroffen. Wanneer de staven in lengte toenamen bevatten zij grote korrels aan de polen.

Waarschijnlijk ontstaan de korrels als kleine vaag begrensde plekjes, die iets dichter zijn dan het cytoplasma of als zeer kleine korrels, die dichter en scherper begrensd worden resp. „aangroeien” tot grote korrels.

Wanneer wij namelijk bacteriën van stammen, die regelmatig korrels bevatten, in of dadelijk na dwarsdeling zagen, dan waren de nieuwe bacteriën ieder van twee grote poolkorrels, van één korrel aan de pool die het verst verwijderd was van de delingsplaats, van in grootte sterk verschillende korrels, of van één korrel en één vaag begrensd dicht plekje voorzien. (Fig. 6.) Voorts kwamen in 24—48 uur oude cultures, behalve bacteriën met korrels, ook bacteriën voor die kleine, dichte, ronde of ovale, vaag begrensde gebiedjes aan de polen bevatten.

¹ Tegenover de opvatting van de meeste onderzoekers, dat volutine beschouwd moet worden als vrij(ribo)nucleïnezuur of als een zout van dit zuur (bijv. BELOZERSKY 1947, resp. KÖNIG en WINKLER), staat de reeds genoemde mening, dat volutine opgebouwd is uit (zich eveneens metachromatisch kleurende) metaphosphaten. BORVIN denkt, dat volutine zeker niet uit nucleïnezuur bestaat, maar een „metaphosphoproteïne” is.

Vermoedelijk is het volutine, mede door de uiteenlopende oplosbaarheid, bij de verschillende bacteriesoorten op verschillende wijze opgebouwd.

In cultures van de stam H37Rv, die weinig korrels vormde, bevatten vele bacteriën aan de polen ronde of ovale, vaag begrensde plekjes, die dichter waren dan het cytoplasma (zoals ook een enkele maal in de polen van bacteriën van andere humane stammen gevonden werden, wanneer deze polen geen korrels bevatten). Naarmate de cultures ouder werden, nam de dichtheid van sommige plekjes toe, zodat in oude cultures deze plekjes soms het aspect van korrels hadden, maar meestal de polen kapvormig vulden. De op deze wijze ontstane korrels zijn waarschijnlijk anders samengesteld en moeten vermoedelijk beschouwd worden als een uiting van degeneratie. Zij kwamen in oude cultures voor en wel vooral in bacteriën met vlekkelig gedifferentieerd cytoplasma; niet zelden waren zij dan door een weinig diepe insnoering van de rest van het bacterielichaam gescheiden. Zij konden door intensieve blootstelling aan electronen nooit beschadigd worden.

Het is zeer waarschijnlijk, dat de opvatting van WESSEL, die het verschil in samenstelling betrof, op de korrels en de dichte plekken (die wij in bacteriën van de stam H37Rv vonden) betrekking had, te meer waar hij de voor electronen niet gevoelige korrels vooral in overigens bijna lege bacteriën vond.

Het is niet onaannemelijk, dat een gedeelte der korrels in de reeds genoemde lytische plekken in de cultures van de stammen BE en R408 uit aldus gevormde dichte plekjes bestond, daar de meeste van deze korrels niet gevoelig bleken te zijn voor electronen. (Evenals de eerder genoemde, met volutinekorrels overeenkomende elementen, waren deze laatste korrels als volumineuze structuren in geschaduwde preparaten te zien.)

2) *Transparante gebieden.* Vooral in jonge cultures van *M. avium*, minder frequent in jonge cultures van de andere types, bevatten vele bacteriën regelmatig door het cytoplasma verspreide, ronde, ovale (of waar zij met elkaar in contact waren, als een mozaiek liggende hoekige) plekken, die meestal slechts weinig transparanter waren dan het overige cytoplasma — voorzover nog van overig cytoplasma gesproken kon worden, want dikwijls werd de gehele bacterie door deze plekken gevuld. (Fig. 7.)

Deze plekken waren omgeven door een fijne membraan, waarop soms kleine, iets dichtere stipjes lagen. Wat hun vorm betreft, deden de plekken denken aan vacuolen; als vacuolen werden zij reeds beschouwd door LEMBKE c.s. (1940) en KNAYSI c.s. (1950). De laatsten namen waar, dat de korrels vervormd werden, wanneer zij naast vacuolen lagen. Zij beschouwden dit verschijnsel als uiting van de turgescentie van de vacuolen.

Niet altijd was deze vervorming waar te nemen. Soms waren inderdaad de korrels halvemaanvormig, met de concave zijde tegen de vacuole aanliggend (Fig. 8); ook in bacteriën die geen vacuolen

bevatten, zagen wij zo gevormde korrels, waaruit zou kunnen blijken, dat de korrels de halvemaanvorm behouden, wanneer de vacuolen reeds verdwenen zijn. In andere bacteriën kwamen echter ronde of ovale, dus niet vervormde korrels naast de vacuolen voor. Enige malen werden bacteriën gevonden, waarvan de wand op de plaats waar zich vacuolen bevonden, uitgebocht scheen te zijn. (Fig. 9.)

In sommige lange bacteriën van *M. avium* kwamen dergelijke vager begrensde, niet door membranen omgeven en bijna transparante vormsels voor. Soms lagen deze even regelmatig als de vacuolen, andere malen echter onregelmatiger in het cytoplasma gerangschikt. In enkele bacteriën kwamen deze plekken mét vacuolen voor.

Als zulke bacteriën geschaduwd werden, bleek dat de bacteriewand op de plaats, waar zich deze transparante plekken bevonden, sterk ingevallen was. (Fig. 10.) Op de plaats van de vacuolen was het bacterieoppervlak nauwelijks ingevallen en was er slechts een aanduiding van vacuolenbegrenzungen te zien.

Waarschijnlijk kunnen transparante plekken ontstaan, doordat de inhoud van sommige vacuolen vervloeit; bij het drogen van de bacteriën blijft dan van deze inhoud slechts een residu over. De vacuolen zouden slechts weinig meer vocht bevatten dan het overige cytoplasma, gezien de resultaten van het onderzoek van geschaduwde bacteriën.

Bij de meeste bacteriën verdwenen de vacuolen spoorloos, zodat later in de cultures van *M. avium* kleinere staafjes met volkomen homogeen cytoplasma zonder vacuolen voorkwamen.

Bij sommige bacteriën was duidelijk te zien, dat de transparante plekken conflueerden. Bij andere bacteriën leek het, alsof deze transparante plekken in kleinere plekjes uiteengevallen waren, zodat het cytoplasma een schuimig aspect had.

Een aantal onderzoekers (o.a. ROBINOW en COSSLETT 1948) wees op de mogelijkheid, dat kernaequivalenten van bacteriën zich bij electronenmicroscopisch onderzoek voordoen als vaag begrensde, minder dichte tot transparante gebieden. In sommige bacteriën van de humane stammen en *M. phlei*, een enkele maal ook van *M. avium*, kwamen ongeacht de leeftijd der cultures en de aard van het medium, enkele (2—4) ovale tot ronde, vaag begrensde, minder dichte tot vrijwel transparante gebieden voor, waarvan de ligging met die der kernen zou kunnen overeenkomen. De mogelijke betrekking tussen deze gebieden en kernaequivalenten zal bij de beschrijving der kernkleuring ter sprake gebracht worden.

3) *Het overige cytoplasma.* In vrijwel alle bacteriën, vooral van jonge cultures, bleek het cytoplasma homogeen en variërend in dichtheid te zijn. Soms waren de bacteriën zo transparant, dat zij nauwelijks van de achtergrond te onderscheiden waren, andere malen waren zij

zo dicht, dat de korrels slechts weinig met het overige cytoplasma contrasteerden. Niet alleen verschilden de bacteriën in verschillende preparaten in dichtheid, zodat deze variatie als afhankelijk beschouwd zou kunnen worden van factoren buiten de bacterie (zoals bijv. de dikte van het formvarvlies of de gebruikte electronensnelheid) maar ook de dichtheid van de bacteriën in één keten kon sterk variëren; zoals in een 11 dagen oude cultuur van H37Rv op Dubos' agar waarin enkele strengen — voor het overige bestaande uit vrij dichte bacteriën — uitlopers bezaten, waarin slechts transparante homogene staven gevonden werden. (Fig. 10.)

In oudere cultures kwam het voor, dat het cytoplasma van verscheidene bacteriën differentieerde tot onregelmatig gevormde, wazig begrensde dichtere en transparante plekjes, zodat een vlekkelijke tekening ontstond.

De ovale of bijna ronde bacteriën in de oudere cultures hadden, als zij geen poolkorrels meer bevatten, vrijwel steeds polen die dichter waren dan het centrum: een beeld dat doet denken aan het licht-microscopisch beeld van de poolkapjes in gekleurde bipolaire staafjes.

Dat het cytoplasma, met uitzondering van de beschreven vormsels een vrij homogeen aspect heeft, vindt waarschijnlijk zijn oorzaak in het gebrek aan contrast tussen de verschillende structuurelementen. In lytische plekken — voorkomend in enkele oudere cultures van de stammen R408 en BE — vonden wij massa's waarvan sommige nog de bacterievorm bezaten en die alle lytisch veranderd waren. Deze massa's bleken in ongeschaduwde preparaten vrijwel homogeen te zijn. Na schaduwen was echter duidelijk te zien, dat het cytoplasma in fijne korreltjes uiteengevallen was. (Fig. 2, 3 en 4. Overigens is van schaduwen slechts een contrastverhogende werking te verwachten, voorzover het om oppervlaktestructuur, dus reliëf gaat.) Dit gebrek aan contrast heeft waarschijnlijk twee oorzaken, namelijk het feit dat de eventueel aanwezige, fijnere structuurelementen bijna uitsluitend bestaan uit organische stof en dus vrijwel gelijke dichtheid bezitten; voorts de superpositie van verschillende structuren, waardoor bijv. vele zichtbare vormsels slechts vaag begrensd lijken te zijn.

Om deze laatste moeilijkheid te overkomen, werden coupes — 100 à 300 Å dik — van kolonies van een 1 maand oude cultuur van H37Rv gesneden.¹ Bij onderzoek van deze coupes bleek, dat in sommige lengtedoorsneden ovale, scherp begrensde, transparantere plekken voorkwamen. In deze plekken was een onduidelijke differentiatie te zien in iets dichtere en minder dichte plekjes (Fig. 12.) De ligging van deze plekken deed denken aan de localisatie van kernen. Andere lengtedoorsneden lieten evenwel slechts het bovenbeschreven aspect zien: een nagenoeg homogeen cytoplasma met dichte plekken aan de polen.

¹ De coupes werden gesneden door de heer W. G. BRAAMS.

4) *Het bacterie-oppervlak*. Reeds lang is bekend, dat het oppervlak van Mycobacteriën hydrophoob is. Sinds de ontdekking van de tuberkelbacterie heeft men gemeend deze hydrophobie, met de zuurvastheid, te verklaren, door het bestaan van een waskapsel om de bacteriën aan te nemen. Aangezien uit verscheidene onderzoekingen bleek, dat Mycobacteriën na behandeling met diverse vetoplosmiddelen nog zuurvast waren, (v. DUBOS 1947) verwiërp men het bestaan van een waskapsel, óf hechtte aan zulk een kapsel geen betekenis voor de zuurvastheid.

REED c.s. (1948) meenden echter, dat de tuberkelbacteriën zonder twijfel door een waskapsel omgeven zouden zijn. Zij vonden bij electronenmicroscopisch onderzoek dergelijke kapsels om bacteriën van een B.C.G. stam, die gesuspenseerd waren in een sterk hyper-tonische lactose-oplossing. De gepubliceerde photo's zijn echter zeker niet overtuigend en het beeld van de kapsel is eerder toe te schrijven aan inkrimpen van het cytoplasma door de uitzonderlijke osmotische verhoudingen. De gelijktijdig gepubliceerde opnamen van bacteriën van dezelfde stam, gesuspenseerd in hypo- en isotonische lactose-oplossingen laten inderdaad geen kapsel zien.

Ook BALOGH en GUBA (1953) beschreven een dergelijke kapsel bij hun onderzoek van humane tuberkelbacteriën, die uit tuberculeuze lympheklieren afkomstig waren. Het is niet bekend, hoe de bacteriën behandeld werden voor de bereiding van de preparaten. De vorm, die zij waarnamen, hebben wij slechts éénmaal gevonden in een cultuur van H37Rv op de voedingsbodem van Loewenstein: een vrij dichte, op enkele plaatsen onderbroken, maar overigens regelmatig gevormde streng, omgeven door een minder dichte, vrij brede en vaag begrensde halo.

Daarentegen vonden de meeste onderzoekers (waarvan wij LEMBKE c.s. 1940, KNAYSI 1951 en WERNER 1951 noemen) nooit aanwijzingen voor de aanwezigheid van een waskapsel. Evenmin hebben wij ooit beelden gevonden, die een argument vormden voor het bestaan van een waskapsel. De onderzochte bacteriën bleken slechts omgeven te worden door een ca 20 m μ dikke wand.

WERNER (1951), die vooral suspensies van tuberkelbacteriën onderzocht, vond herhaaldelijk om de bacteriën een korrelige of vloeiende lijn, die op enige afstand van de bacterie, de contouren van deze volgde. Hij zag in dit phenomeen een uiting van de hydrophobie van het bacterieoppervlak en verklaarde het ontstaan van deze lijnen, door aan te nemen, dat de steeds wel in het suspensiemiddel aanwezige fijne partikeltjes bij het drogen van het preparaat niet onmiddellijk naast de bacterie, doch op enige afstand van de bacteriewand worden afgezet.

In vele preparaten, vooral preparaten gemaakt door afdrukken van de cultuur, vonden wij om verscheidene bacteriën een vrij smalle

ruimte, minder dicht dan het cytoplasma, die weer omgeven was door een min of meer vloeiende lijn. De ruimte tussen de bacterie en deze lijn was soms minder dicht dan het omgevende vlies, andere malen was zij iets dichter. Daar het hier afdrukpreparaten betrof (en zeker wanneer deze niet gespoeld waren met gedestilleerd water), kon deze lijn niet als uiting van hydrophobie verklaard worden. Te meer kon deze verklaring niet dienen, waar bij in deling zijnde of zich juist gedeeld hebbende bacteriën, de lijn ook tussen de delingsvlakken doorliep of de contouren van de bacteriën zó volgde, dat zij bij het delingsvlak in contact was met de bacteriën; verscheidene malen bleken voorts, bij parallel liggende staven, de lijnen om de bacteriën zich te verenigen — na de polen gevolgd te hebben — om als één lijn in de scheiding tussen de bacteriën over te gaan.

Van een lijn, ontstaan als uiting van hydrophobie, zou daarentegen verwacht moeten worden, dat zij op alle punten op gelijke afstand van de bacterie zou blijven.

Bij de vergelijking van geschaduwde en niet geschaduwde preparaten bleek, dat deze lijn steeds een artefact was en dat het voorkomen van de lijn kon berusten op een van de volgende twee oorzaken: de meest voorkomende oorzaak was een geringe plasmolyse, zodat bij het drogen het cytoplasma inkromp en een ruimte ontstond tussen het cytoplasma en de bacteriewand, die, waar hij het cytoplasma niet bedekte, plat gevouwen werd. In opnamen van geschaduwde preparaten (waarvoor om aesthetische redenen het negatief gekozen werd) waren de bacteriën dan als helwit te zien, waarom een iets donkerder platgevouwen bacteriewand lag.

Het feit, dat met de bacteriën vaak een fijn laagje voedingsbodem meegenomen werd bij het maken van de preparaten, moet als tweede oorzaak genoemd worden voor het ontstaan van een dergelijke lijn. Bij het drogen wordt het bacterie-oppervlak kleiner, zodat er een lege ruimte ontstaat tussen de bacteriewand en de rand van het laagje voedingsbodem. In opnamen van geschaduwde preparaten was de rand van het laagje voedingsbodem witter dan de rest van het vlies en de ruimte tussen voedingsbodem en bacteriewand diepzwart, aanzien hier geen metaal bij het schaduwen terechtkwam. (Fig. 13.) Uiteraard kunnen er grensgevallen voorkomen, die niet te verklaren zijn, te meer waar ook de plooi van de lege bacteriewand soms witter was dan het overige deel van de wand, waarschijnlijk doordat de wand dan zo stug was, dat hij niet geheel platgevouwen werd en op de plaats van plooiing nog bleef opstaan.

De (geringe) plasmolyse kwam vooral voor in eerst gefixeerde en later gedroogde preparaten. Zij was minder uitgesproken, wanneer de preparaten eerst gedroogd en later gefixeerd werden, maar kon dan toch niet geheel vermeden worden. Spoelen met gedestilleerd water of aether bleek geen invloed uit te oefenen.

Met de gebruikte vergrotingen (6000—10000 maal) was het niet mogelijk, in deze bacteriewand (bijv. in de lege bacteriewanden die in cultures van *M. avium* voorkwamen) enige structuur te onderscheiden.

KNAYSI (1950) beschreef als tweede oppervlaktestructuur binnen de bacteriewand een — het cytoplasma omgevende — „cytoplasma-membraan”. Zekere aanwijzingen voor het bestaan van een dergelijke membraan hebben wij niet gevonden.

Volgens BLOCH (1950) zou een der factoren die de virulentie bepalen, een toxische substantie zijn die de bacteriën der virulente stammen omhult en met verscheidene stoffen zoals hexaan geëxtraheerd kan worden. Tussen het oppervlak van de bacteriën der (virulente) humane stammen en die van *M. avium* en *M. phlei* konden wij geen verschil vinden. Proeven van WERNER (1951) die tot doel hadden, deze factor aan te tonen met het electronenmicroscop, zoals behandeling met hexaan, hadden slechts scheuren in de ketens van bacteriën ten gevolge.

Dat wij deze factor (of een waskapsel) niet konden waarnemen, betekent uiteraard niet, dat geen vrije lipoiden aan het oppervlak van de bacterie zouden voorkomen. Het is mogelijk dat deze in zo geringe hoeveelheid voorkwamen, dat zij niet waargenomen konden worden.

•

IV

KERNKLEURING BIJ MYCOBACTERIËN

Inleiding

Bij het electronenmicroscopisch onderzoek bleek het niet mogelijk te zijn, enig vormsel in de bacteriën met zekerheid als kern of kernaequivalent te beschrijven. Op verschillende wijzen trachtten wij daarom licht- of electronenmicroscopisch deze kernen zichtbaar te maken, gebruik makend van de stelling, dat het desoxyribonucleïnezuur (D.N.Z.) van weefselcellen slechts in de kernen aanwezig is. Wanneer nl. door kleuring resp. contrastverhoging het D.N.Z. in de Mycobacteriën zichtbaar gemaakt is, kunnen wij althans de chemische equivalenten van de weefselkernen in de bacteriën localiseren en zien welke electronenmicroscopisch waargenomen vormsels in grootte en ligging met deze kernaequivalenten overeenkomen. Te meer is dit van belang, omdat er ten aanzien van plaats en verspreiding en de overeenkomst van kernaequivalenten met andere vormsels verschillende meningen bestaan.

Volgens LEMBKE (1947), die tuberkelbacteriën met ultraviolet licht onderzocht, zou het D.N.Z. in jonge tuberkelbacteriën door het gehele lichaam verspreid liggen en zich bij oudere bacteriën bij de polen concentreren.

BRIEGER en ROBINOW (1947) zagen, na kleuring volgens Piekarski-Robinow (zie onder), herhaaldelijk diffuse verspreiding van het D.N.Z. over grote gedeelten van vertakte vormen van *M. avium*.

Volgens RUSKA c.s. (1952) zouden de dichte, met het electronenmicroscop waargenomen korrels en de kernaequivalenten gelijk gelocaliseerd liggen (deze opvatting werd eerder door BRINGMANN, 1951, voor *C. diphtheriae* beschreven).

MALEK en STERZL (1948) kleurden tuberkelbacteriën volgens Piekarski-Robinow, Gram en Ziehl-Neelsen en meenden, dat de kernen identiek zouden zijn met de granula van Much.

LILLIE (1947, 1954 blz. 133) kon in bacteriën van verscheidene soorten (waaronder tuberkelbacteriën) geen Feulgen-positieve substantie aantonen.

Bespreking van de methode

Aangezien het ribosenucleïnezuurgehalte van bacteriën zeer hoog is, (volgens BOIVIN 1947, 1948, 5—20%, ook van tuberkel bacteriën) kunnen de kernen van de bacteriën niet zonder meer met basische kleurstoffen gekleurd worden. O.a. door deze moeilijkheid kwam het, dat andere

vormsels, die grote affiniteit bezitten voor basische kleurstoffen, zoals volutinekorrels, als bacteriekernen geïnterpreteerd werden en dat er verschillende opvattingen ontstonden over de vorm van deze kernen. (Sommigen betwijfelden zelfs, of bacteriën wel een kern zouden bezitten. Voor een overzicht over deze theorieën v. DUBOS 1947).

De belangrijkste principes van kernkleuring, die in de loop van de tijd werden beschreven, zijn:

1) de verwijdering van het ribosenucleïnezuur uit het cytoplasma, waarna als vrijwel enige basophile stof het D.N.Z. overblijft, dat dan met een basische kleurstof (meestal Giemsa-oplossing of methyleenblauw, maar ook met andere basische kleurstoffen zoals fuchsine, SMITH, 1950, bij *E. coli*) gekleurd kan worden. Het ribosenucleïnezuur kan o.m. verwijderd worden met N/1 zoutzuur (PIEKARSKI 1937, ROBINOW 1947), N/10 natronloog of M/30 secundair natriumphosfaat (WELSCH en NIHOUL 1948) of met ribonuclease (BOIVIN 1948).

2) het vrijmaken van de oorspronkelijk in het D.N.Z. gebonden aldehydegroepen van de desoxyribose, die aan het reagens van Schiff (een door zwaveligzuur ontkleurde oplossing van basisch fuchsine) onder vorming van een roodvioletten verbinding, of aan een thionine-SO₂ reagens kunnen gebonden worden (DELAMATER 1951, VAN DUIJN 1954, 1956) waarbij een blauwe verbinding ontstaat. Deze aldehydegroepen in D.N.Z. kunnen met behulp van enkele zuren vrijgemaakt worden. N/1 zoutzuur wordt het meest gebruikt (de reactie van Feulgen), maar ook perchloorzuur kan gebruikt worden, zoals CASSEL (1950), bij onderzoek van *Bacillus cereus* aantoonde.

Het is van voordeel, de klassieke methode: hydrolyse met N/1 zoutzuur te gebruiken, omdat deze het meest gebruikt is en dan vergelijking van de resultaten der twee principes mogelijk is. In het algemeen schijnen de resultaten van de hydrolyse-Giemsakleuring fraaier te zijn, daar het cytoplasma nog duidelijk en de kernen zeer intensief gekleurd zijn. (ROBINOW 1947). Daarentegen zijn de reacties op aldehyden selectiever. Wat deze selectiviteit betreft, staan deze beide reacties op gelijk niveau (VAN DUIJN c.s. 1954).

Het onderzoek met ultraviolet licht (LEMBKE) is selectiever dan de kleuring met basische kleurstoffen, maar absorptie van één bepaalde golflengte geschiedt door purine- en pyrimidinebasen, welke in beide nucleïnezuuren voorkomen (DUBOS 1947, STACEY 1947), zodat de methode niet geheel betrouwbaar is.

De gebruikte methodes

Bacteriën van de humane stammen H37Rv, SE en R408, van *B.C.G.*, *M. avium* en *M. phlei* werden onderzocht.

Voor de kleuring met het thionine-SO₂ reagens en de hydrolyse-Giemsa methode werden uitstrijkjes gemaakt van de cultures. Deze preparaten werden gefixeerd in 1 % osmiumtetroxydedamp. Later

werden stukjes beënte en bebroede Dubos' agar uitgesneden, gedurende drie minuten gefixeerd in 1 % osmiumtetroxydedamp en daarna op objectglasjes gedept. Deze preparaten werden volgens Feulgen en volgens Piekarski-Robinow gekleurd.

De kleuring met Schiff's of thionine-SO₂ reagens verliep als volgt:

- 1) de preparaten werden gedurende 10 minuten in N/1 zoutzuur van 58°—62° C geplaatst,
- 2) gedurende 10 minuten gespoeld in stromend kraanwater,
- 3) gedurende 15 minuten gekleurd met thionine-SO₂ of met Schiff's reagens¹,
- 4) drie maal gespoeld in opeenvolgende baden van SO₂ bevattende vloeistof (2 g natriumbisulfiet, opgelost in 400 cm³ gedestilleerd water, waaraan 20 cm³ N/1 zoutzuur toegevoegd werd) om het niet chemisch gebonden fuchsine-SO₂ te verwijderen,
- 5) gedurende 10 minuten in stromend kraanwater gespoeld.

Steeds werden ter contrôle gehydrolyseerde en niet gehydrolyseerde coupes (van konijnennieren of muizenlongen) en niet gehydrolyseerde bacteriepreparaten meegekleurd.

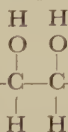
Bij gebruik van de methode van Piekarski-Robinow werden de preparaten gedurende 10 minuten in N/1 zoutzuur van 60° geplaatst, daarna gedurende 10 minuten in stromend kraanwater gespoeld, met gedestilleerd water nagespoeld en vervolgens gedurende verscheidene (tot 18) uren gekleurd met Giemsa-oplossing (drie druppels Giemsavloeistof per cm³ gedestilleerd water).

VAN DUIJN c.s. (1954) beschreven een methode, volgens welke het mogelijk is, zowel het D.N.Z. als bepaalde slechts bij hoge uitzondering in de kern voorkomende polysacchariden specifiek² te kleuren.

¹ Het thionine-SO₂ reagens werd bereid, door 200 mg thionine in 100 cm³ gedestilleerd water, onder verwarming tot 100° C, op te lossen, de oplossing af te koelen en met gedestilleerd water tot het oorspronkelijke volumen aan te vullen. Hierbij werd 100 cm³ tertiaire butylalcohol en 24 cm³ van een 1,1 N zoutzuur oplossing gevoegd. Daarna werd aan dit mengsel 3 g natriummetabisulfiet toegevoegd.

Het Schiff's reagens werd bereid, door 0,5 g basische fuchsine in 100 cm³ 0,15 N zoutzuur op te lossen. Hieraan werd 0,5 g natriummetabisulfiet toegevoegd. Het mengsel werd gedurende twee uur in een schudmachine geschud en daarna gefiltreerd. Na toevoegen van 300 g beenderkool werd het mengsel even geschud en daarna weer gefiltreerd.

Voor een meer gedetailleerde beschrijving betreffende de bereiding van de kleurstoffen verwijzen wij naar VAN DUIJN (1956), resp. VAN DUIJN c.s. (1954).



² Door perijoodzuur wordt de 1—2 glycolbinding (—C—C—) die in verscheidene,

slechts in het cytoplasma voorkomende stoffen gevonden wordt, verbroken en

Aangezien deze „combinatiekleuring” in weefselcoupes zeer fraaie resultaten te zien gaf, met goed contrast tussen blauwgekleurde kern en roodviolet gekleurd cytoplasma, werd deze kleuring ook op de bacteriën beproefd. De door behandeling met normaal zoutzuur in D.N.Z. vrijgemaakte aldehydegroepen werden op de boven beschreven wijze gebonden aan thionine reagens. Na wassen met SO₂ bevattende vloeistof en spoelen met stromend kraanwater werden de preparaten

- 1) geplaatst in een perjoodzuuroplossing van 37° C (400 mg kaliumperjodaat opgelost in 100 cm³ N/10 zwavelzuur) gedurende 15 minuten,
- 2) gedurende 10 minuten met kraanwater gespoeld.
- 3) gedurende 15 minuten in Schiff's reagens geplaatst,
- 4) in drie opeenvolgende baden van de SO₂ bevattende vloeistof geplaatst (in elke van deze baden gedurende 10 minuten) en
- 5) gedurende 10 minuten in kraanwater gespoeld.

Resultaten van de combinatiekleuring

In de preparaten van 2, 4, 7, 12 en 18 dagen oude cultures van H₃₇Rv, *M. avium* en *M. phlei* op Dubos' agar waren de bacteriën roodviolet gekleurd. Het blauw der kernen was niet te zien en werd waarschijnlijk door het rood overdekt. Verlenging van de kleuringstijd met thionine-oplossing tot 30 minuten, verkorting van de inwerkings-tijd van Schiff's reagens tot 10 minuten en verlaging van de temperatuur van de perjoodzuuroplossing tot kamertemperatuur hadden geen invloed.

De contrôlepreparaten voldeden aan de verwachtingen: 1) de niet gehydrolyseerde, niet met perjoodzuur behandelde coupes en bacteriepreparaten waren niet gekleurd. 2) In de slechts met normaal zoutzuur behandelde coupes (van muizenlongen met necrotische tuberculeuze haarden) waren chromatine en membraan der kernen blauw gekleurd. In de haarden werden vele blauw gekleurde brokstukken en vooral aan de rand van de haarden talrijke lichtblauwe korrels gevonden. In de overeenkomstige volgens Ziehl-Neelsen gekleurde preparaten werden vooral aan de rand der haarden grote hoeveelheden zuurvaste staven gevonden. De korrels waren waarschijnlijk de kernen der tuberkelbacteriën, de blauwe brokstukken de uiteengevallen celkernen. In de niet aangetaste longgedeelten was het cytoplasma der cellen niet gekleurd. 3) In de met zoutzuur én perjoodzuur behandelde coupes was het cytoplasma roodviolet gekleurd. De kernen en brok-

worden de hydroxylgroepen tot aldehydegroepen geoxydeerd. Aan deze aldehydegroepen kan het thionine-SO₂ of Schiff's reagens gebonden worden. De reactie is ook mogelijk, wanneer één der hydroxylgroepen door een amino- of alkylaminegroep gesubstitueerd is. Is een van beide groepen in ketovorm aanwezig, dan wordt alleen de andere groep tot aldehydegroep geoxydeerd. (HOTCHKISS 1948, Mc MANUS 1946, Mc MANUS en CASON 1951).

stukken van kernen waren blauw gekleurd. De kleine korrels in de haarden waren niet te vinden. De resultaten van deze combinatiekleuring van de bacteriën voldeden dus niet aan de gestelde verwachtingen.

Resultaten van de kleuring met thionine-SO₂ reagens

De gehydrolyseerde coupes van muizenlongen met tuberculeuze haarden hadden het bij de combinatiekleuring onder 2) reeds beschreven aspect. De niet gehydrolyseerde coupes en bacteriepreparaten waren niet gekleurd. In alle gehydrolyseerde bacteriepreparaten (van 2, 4, 7, 12 en 18 dagen oude cultures van H37Rv, *M. avium* en *M. phlei* op Dubos' agar) waren lichtblauwe korrels te zien, die in strengen, velden of kleine rijtjes gerangschikt of geïsoleerd lagen. Het cytoplasma der bacteriën was nauwelijks of niet te onderscheiden. Door de ligging van de korrels onderling en door vergelijking met de overeenkomstige volgens Ziehl-Neelsen gekleurde preparaten, was wel uit te maken hoeveel van deze korrels per bacterie zouden voorkomen. Daarenboven was het mogelijk, het cytoplasma van sommige bacteriën met verzadigde pikrinezuuroplossing gedurende $\frac{1}{2}$ —1 minuut zó zwak te kleuren, dat het lichtblauw der korrels in verscheidene bacteriën nog waar te nemen was.

In alle preparaten van *M. phlei* werden grote velden van lichtblauwe ronde en ovale korrels gevonden. Enkele geïsoleerd liggende korrels kwamen voor.

In de preparaten van *M. avium* en H37Rv werden in het begin van de cultuur slechts enkele ronde en ovale korrels gevonden. Na 4 en 7 dagen kwamen er ook kleine staafjesvormige korrels voor. Aan de periferie van de strengen en velden werden kleine rijtjes van 2—4 korrels gevonden. Bij H37Rv kwam ditzelfde beeld ook na 12 en 18 dagen voor. In de oudere cultures van *M. avium* werden behalve velden van korrels ook ronde en ovale, geïsoleerd of in rijen van 2—16 liggende korrels gevonden. (Na kleuring met pikrinezuur was te zien, dat inderdaad meer dan één korrel per bacterie voorkwam).

Verscheidene cultures van verschillende leeftijd op verschillende voedingsbodems werden op gelijke wijze onderzocht. Van deze cultures werden ook preparaten volgens Ziehl-Neelsen en volgens Piekarski-Robinow gekleurd.

Gehydrolyseerde coupes en niet-gehydrolyseerde coupes van muizenlongen en niet-gehydrolyseerde bacteriepreparaten werden eveneens met de thionine-SO₂ oplossing gekleurd. Deze controlepreparaten hadden het bij de combinatiekleuring onder 2) en 1) beschreven aspect.

De resultaten van deze kleuringen kunnen in het volgende schema samengevat worden:

Stam/type	Voedings-bodem	Leeftijd van cultuur	Kleuring volgens Ziehl-Neelsen	Kleuring met thionine-reagens	Hydrolyse-Giemsa kleuring
H ₃₇ Rv	Loew. met glycerine	3 weken	Egaal gekleurde zuurvaste staven, enkele met korrels van Much	Ronde of ovale korrels in grote velden	Staven met 1—4 korrels, staven met 1—2 langgerekte korrels; egaal en intensief gekleurde bacteriën
H ₃₇ Rv	Loew. met glycerine	4 weken	Kleine en lange egaal gekleurde zuurvaste staven	Ronde of ovale korrels of kleine staafjesvormen, geïsoleerd, in rijtjes van 2—4, of in strengen en velden	Lange staven met 1—4 korrels; in kleinere staafjes 1—2 korrels. Enkele met 6 of 3 korrels; ook egaal en intensief gekleurde bacteriën
H ₃₇ Rv	Loew. zonder glycerine	4 maanden	Lange fletsgekleurde zuurvaste staven; sommige met korrels van Much	Ovale of langgerekte korrels, geïsoleerd of in strengen	Langgerekte ovale korrels, 1—2 per bacterie of 2—4 ronde korrels per bacterie
M.avium M.avium	Dubos' agar Dubos' agar	3 weken 3 weken	Kleine zuurvaste staafjes en lange niet-zuurvaste draden, al of niet met zijttakken	Ronde of ovale korrels in velden, geïsoleerd, of in lange rijen van 4—16	Kleine ovale staafjes met 1 ovale korrel, die het cytoplasma vrijwel geheel opvult. Lange draden met 1—8 korrels, egaal en flets gekleurde draden; enkele draden met lange egaal en intensief gekleurde stukken
R408	Loew. met glycerine	2 weken	Egaal gekleurde zuurvaste staven, enkele met korrels van Much	Ronde korrels of staafjesvormen in serpentine's of in rijtjes van 2—4	Staven met 2—6 ronde korrels. Enkele egaal en intensief gekleurde staven
SE	Vloeibaar Dubos' medium	3 maanden	Serpentine's van zuurvaste staven en staafjes. In de staven grote donkere zuurvaste korrels	Ronde of ovale korrels in lange serpentine's	Lange staven met 2—6 korrels, kleinere staafjes met 1 korrel. Enkele staven met een langgerekte korrel
BCG	Vloeibaar Dubos' medium	5 weken	Lange zuurvaste staven; enkele flets gekleurde zuurvaste reuzenvormen	Ronde of ovale korrels in grote velden	Bacteriën met 1—4 ronde of ovale korrels. Reuzenvormen niet gevonden
BCG	Loew. met glycerine	5 weken	Lange zuurvaste staven. In geïsoleerd liggende bacteriën korrels van Much	Ronde of ovale korrels in kleine groepjes of in rijtjes van 2—4	1—6 ronde of ovale korrels per bacterie. Ook egaal en intensief gekleurde bacteriën
BCG	Loew. met glycerine	5 maanden	Kleine zuurvaste staafjes	Ovale en ronde korrels in grote en kleine velden.	Kleine staafjes met 1—2 ovale korrels. Enkele langere bacteriën

Resultaten van de kleuring volgens Feulgen en Piekarski-Robinow

Tijdens de groei op Dubos' agar van de stammen SE en Av werden om de 2 à 3 dagen, van de eerste tot de 37ste dag na enting, preparaten gemaakt door de (gefixeerde) cultuur op objectglazen af te drukken.

Resultaten van de kleuring volgens Feulgen:

In de gehydrolyseerde coupes van konijnennieren waren slechts chromatine en membraan van de kernen roodviolet gekleurd. De niet gehydrolyseerde coupes en bacteriepreparaten waren niet gekleurd.

In de gehydrolyseerde bacteriepreparaten was het cytoplasma nauwelijks of niet te onderscheiden. Slechts aan de periferie der kolonies was na te gaan, hoeveel korrels per bacterie zouden voorkomen. In de preparaten van de stam SE waren 1 dag na enting geen korrels te vinden. Na 3 en 6 dagen werden kleine, licht roodviolettae staafjesvormige en ovale korrels gevonden. Na 9 dagen werden vooral kleine ronde en ovale en minder staafjesvormige korrels gevonden. Naast de strengen kwamen ook geïsoleerd liggende korrels voor en in de periferie werden kleine rijtjes van 2—4 korrels gevonden.

Bij de stam Av werden reeds 24 uur na enting in groepjes of geïsoleerd liggende, ovale of ronde korrels gevonden. Na 3 en 6 dagen lagen de ronde of ovale korrels in rijtjes van 2—6 of in kleine velden, en kwamen er ook staafjesvormige korrels voor. Later lagen de korrels geïsoleerd, in rijen die 8—16 korrels bevatten, of in grote kolonies.

Bij beide stammen waren de korrels 3 en 6 dagen na enting fletser gekleurd dan de korrels die later gevonden werden.

In de volgens Piekarski-Robinow gekleurde preparaten van beide cultures werden 1 dag na enting kleine staafjes gevonden, met een ovale donkerblauw gekleurde korrel, die vrijwel de gehele bacterie vulde en slechts door een smalle lichtblauwe rand omgeven was. Verder kwamen lange staven voor, die 2—4 ronde korrels bevatten of één staafjesvormige korrel. Na 3 en 6 dagen werden in de lange staven 2—4 ronde korrels of 1—2 langgerekte korrels gevonden. In alle preparaten werden verscheidene, gelijkmatig intensief gekleurde bacteriën gezien.

Na 9 dagen was het beeld der twee cultures verschillend.

In de preparaten van de stam SE werden tot het einde van de waarnemingstijd lange of korte staven gevonden met 1—4 ovale of ronde korrels of één (zelden twee) langgerekte korrel. Verscheidene egaal en intensief blauwgekleurde bacteriën kwamen in alle preparaten voor.

Bij de stam Av werden vooral kleine bacteriën met ovale korrels gevonden, die bijna de gehele bacterie vulden. Behalve deze kwamen in alle preparaten nog enkele lange bacteriën met 1—4 korrels voor.

Ook werden in al deze preparaten (tot en met de 37e dag na enting) lange draden, al of niet met zijtakken, gevonden. Enkele van deze

waren egaal en fletsblauw gekleurd, de meeste bevatten echter 2—8 korrels. In weer andere kwamen lange, intensiever gekleurde stukken voor.

Bespreking

In de kleine, rustende bacteriën was de kern rond of ovaal en vulde vrijwel het gehele bacterielichaam.

In bacteriën van actief groeiende cultures, en ook in oude humane cultures werden verscheidene, meestal 2—4 korrels gevonden. Vooral in de jonge cultures namen vele van deze korrels een staafjesvorm aan. Waarschijnlijk waren deze staafjes in de lengterichting van de bacterie uitgroeïende kernen, die evenals de bacterie dwarsdeling ondergingen. Duidelijke delingsfiguren met insnoeringen in deze kernen, werden slechts enkele malen waargenomen, vermoedelijk als gevolg van de geringe afmetingen der kernen. Kwamen er twee kernen voor per bacterie, dan lagen deze meestal nabij het centrum, een enkele maal bij de polen.

Werden meer dan twee korrels per bacterie gevonden, dan lagen deze regelmatig over het bacterielichaam verspreid. Een getal van drie korrels per bacterie kwam, evenals de combinatie van een ronde en een staafjesvormige korrel, niet vaak voor.

In de lange draden in de cultures van *M. avium* lagen de kernen, als er slechts enkele (1—4) gevonden werden, meestal excentrisch en wel bij een der einden van de draden of in een zijtak. Andere draden bevatten geen korrels en waren fletsblauw gekleurd of bevatten intensiever gekleurde kolommen. Na kleuring met thionine-SO₂ of Schiff's reagens was deze diffuse verspreiding niet te zien. Evenmin werden bij toepassing van de reacties op aldehyden, bacteriën gevonden, die in hun geheel gekleurd waren (zoals in de volgens Piekarski-Robinow gekleurde preparaten voorkwamen). Na langer hydrolyseren (tot 15 minuten) van bacteriën uit 3 en 6 dagen oude cultures van de stammen SE en Av werd bij gebruik van de hydrolyse-Giemsa methode nog slechts een enkele egaal en intensief gekleurde bacterie gevonden. Behalve lange bacteriën met 2—4 korrels, kwamen dan fletsgekleurde staafjes en staven voor, die geen korrels bleken te bevatten. Dat bij kleuring volgens Piekarski-Robinow na de gewone tijd van hydrolyse (10 minuten), gelijkmatig en intensief gekleurde staven én bacteriën die korrels bevatten, gevonden werden, zou dan verklaard kunnen worden, door aan te nemen, dat de bacteriën verschillen in gevoeligheid ten opzichte van de hydrolyse, waardoor een gedeelte van de bacteriën langer aan de behandeling met warm normaal zoutzuur onderworpen moet worden, voordat andere basophile stoffen dan het D.N.Z. zó verwijderd worden, dat de kernen zichtbaar gemaakt kunnen worden. Dat na deze langere hydrolyse in andere bacteriën geen kernaequivalenten meer te zien waren en deze bacteriën

dan slechts gelijkmatig fletsblauw gekleurd werden, hangt samen met het feit, dat bij te lange hydrolyse ook het D.N.Z. in kleinere brokstukken uiteenvalt, die uit de kern wegdiffunderen. (Zo bleken de celkernen in de preparaten van muizenlongen met Giemsa-oplossing veel minder intensief gekleurd te worden na 15 minuten hydrolyseren, dan na gelijke behandeling gedurende 10 minuten of wanneer zij niet aldus behandeld waren).

Misschien is, juist vanwege deze afbraak van het D.N.Z. bij langere hydrolyse, ook een andere verklaring mogelijk. Men zou zich kunnen voorstellen, dat in de egaal en intensief gekleurde bacteriën moeilijk te verwijderen basophile componenten — na hydrolyse gedurende 10 minuten — de kernaequivalenten blijven maskeren en dat juist deze stoffen na langere hydrolyse intensief gekleurd worden. In ieder geval moeten de resultaten van de hydrolyse-Giemsa methode steeds gecontroleerd worden met een der reacties op aldehyden.

De relatie van de kernaequivalenten met op andere wijze zichtbaar gemaakte vormsels

De korrels van Much werden slechts in enkele bacteriën, volgens Ziehl-Neelsen gekleurd, gevonden. In de volgens Gram gekleurde deppreparaten van 6 en 9 dagen oude cultures van SE, kwamen Gram-positieve korrels eveneens slechts in enkele bacteriën voor. In vele preparaten, vooral van jonge cultures, konden wij in het geheel geen korrels van Much vinden. Er is dus geen reden enige betrekking tussen beide vormsels aan te nemen.

Evenmin was er een bepaalde verhouding te zien tussen de kernen en de met het electronenmicroscop gevonden dichte korrels. Als er twee kernen per bacterie voorkwamen, lagen zij meestal bij het centrum en slechts een enkele maal bij de polen, terwijl deze laatste plaatsen bij voorkeur door de electronendichte korrels bezet werden. Kleine bacteriën van de stam SE, die alle in overeenkomstige, electronen-microscopisch onderzochte preparaten twee duidelijke dichte korrels bezaten, bleken na kernkleuring slechts één ovale kern te bezitten. Langere bacteriën van dezelfde stam bleken tot 4 kernen te bevatten, een aantal dat vrijwel nooit door de dichte korrels bereikt werd.

Ook op grond van de ligging mag een identiteit tussen de kernaequivalenten en de dichte korrels dus niet aangenomen worden.

Constance gelijke localisatie van kernaequivalenten en electronen-microscopisch waargenomen, dichte korrels zoals RUSKA e.a. aannamen, moet ten eerste betwijfeld worden.

De opvatting van BRINGMANN, dat volutinekorrels en kernaequivalenten bij *Corynebacterium diphtheriae* gelijk gelocaliseerd zouden zijn, kon TRONNIER niet bevestigen (1953).

ROBINOW en COSSLETT (1948) vonden in bacteriën uit jonge cultures van *Pseudomonas aeruginosa* vaag begrensde, minder dichte plekjes,

die in ligging en vorm overeenkwamen met de kernen, die zij volgens Piekarski-Robinow gekleurd hadden.

HILLIER c.s. (1949, 1950) zagen in jonge cultures van *E. coli* eveneens dergelijke minder dichte plekken. In geschaduwde preparaten was het bacterie-oppervlak ter plaatse van deze plekken ingevallen. Ook deze kwamen in ligging en vorm overeen met volgens Piekarski-Robinow gekleurde kernen en ook met licht-microscopisch waargenomen, lichtere plekjes in deze bacteriën in ongekleurde preparaten. (Deze overeenkomst tussen de met licht- en phasecontrast-microscopie waarneembare lichtere plekken en kernen werd o.a. door het onderzoek van TULASNE, 1949, bevestigd.)

Deze, met het electronenmicroscopie gevonden plekken bleken na hydrolyse in N/1 zoutzuur dichter te zijn dan het omgevende cytoplasma.

Reeds eerder werd gewezen op de aanwezigheid van ronde of ovale, vrij vaag begrensde, transparante gebieden in sommige bacteriën van alle types.

Zowel in vorm als in ligging deden deze gebieden, met uitzondering van de bij *M. avium* voorkomende, uit vacuolen ontstane transparante plekken, aan kernen denken. Zij hadden meestal een vrijwel gelijke grootte, lagen aan weerszijden van het centrum en kwamen ten getale van twee tot vier per bacterie voor. Zij kwamen echter onregelmatig en slechts bij een gedeelte van de bacteriën voor, terwijl de door ROBINOW en COSSLETT, en HILLIER c.s. aangegeven plekken wel in alle bacteriën van jonge cultures schijnen voor te komen.

Daarenboven zijn, ook al zouden kernaequivalenten zich in het electronenmicroscopisch beeld als transparantere gebieden voordoen, niet alle transparante plekken als kernaequivalenten te beschouwen.

Bij *M. avium* kwamen transparante plekken voor, die zeer onregelmatig door het bacterielichaam verspreid lagen en als uiting van beginnende degeneratie gezien moeten worden. Als dus sommige van de transparante plekken inderdaad al met kernen, die door onbekende factoren in het electronenmicroscopisch beeld zichtbaar worden, identiek zijn, dan is toch vergelijking alleen op basis van dichtheid bij tuberkelbacteriën onmogelijk.

De „kernkleuring” voor electronenmicroscopisch onderzoek

Van kleuring met organische kleurstoffen mag men geen beter contrast in het electronenmicroscopisch beeld verwachten (HILLIER 1950). De gebruikelijke kernkleuringen kunnen dan ook niet worden toegepast voor het zichtbaar maken van de kernaequivalenten in het electronenmicroscopisch beeld.

Daarentegen zou het misschien mogelijk zijn, de klassieke reactie op aldehyden met een basische zilveroxyde-oplossing uit te voeren, bij welke reactie het zilveroxyde gereduceerd wordt tot metallisch zilver, dat op de plaats van de aldehydegroepen zou neerslaan en

dan als zeer dichte korreltjes met het electronenmicroscop waargenomen zou kunnen worden.

Wij gebruikten hiervoor de methode van BRETSCHNEIDER (1949), welke methode later door BRADFIELD (1954) op *Paracolobactrum* en *Staphylococcus* werd toegepast.

De reactie die driemaal werd uitgevoerd, en wel op 1 maand oude cultures van de humane stam SE, *M. avium* en *M. phlei*, verliep als volgt:

1) van de te onderzoeken cultuur werden enkele entnaaldoogjes afgestreken, gesuspenderd en gedurende een uur gefixeerd in een mengsel van 2 delen verzadigde mercurichloride-oplossing en 1 deel absolute alcohol,

2) de bacteriën verbleven vervolgens een uur in alcoholische jodiumoplossing, om het overvloedige mercurichloride te verwijderen en

3) gedurende 24 uur in een 1 % dimedonoplossing in 90 % alcohol (om eventueel reeds aanwezige vrije aldehydegroepen te blokkeren),

4) werden door alcoholoplossingen met dalend percentage naar gedestilleerd water doorgevoerd,

5) gehydrolyseerd in N/1 zoutzuur van 55° gedurende 12 minuten,

6) herhaaldelijk gewassen in twee maal gedestilleerd water,

7) gedurende 24 uur behandeld met een 10 % zilvernitraatoplossing, (waarvan de pH door toevoeging van enkele druppels 8% ammoniumhydroxyde-oplossing op 8—9 gebracht was en welke vervolgens gefiltreerd was),

8) éénmaal gewassen met gedestilleerd water, waarin een spoor ammoniumhydroxyde voorkwam en herhaaldelijk gewassen met gedestilleerd water,

9) gedurende 24 uur behandeld met een 1 % pepsine-oplossing in N/10 zoutzuur bij 37°,

10) herhaaldelijk gewassen met gedestilleerd water.

Ter controle werden telkenmale ook bacteriën behandeld met N/1 zoutzuur bij kamertemperatuur.

Resultaten

Deze kleuring had niet de beoogde resultaten. Slechts op, of in enkele bacteriën lagen spaarzame en over het hele oppervlak verspreide dichte korreltjes — eenzelfde resultaat als in de controlepreparaten.

Een andere kleuring, op het zelfde principe berustend, werd door GOMORI (1952) beschreven en door DETTMER en SCHWARZ (1954) gewijzigd en gebruikt voor reactie op de door perijoodzuur gevormde aldehydegroepen.

Deze methode pasten wij toe als reactie op de door warm N/1 zoutzuur in D.N.Z. vrijgemaakte aldehydegroepen.

Deze methode werd viermaal toegepast en wel op suspensies van 9 en 14 dagen oude cultures van H37Rv resp. R408 en op afdrukpreparaten van 1 maand oude cultures van M. avium en H37Rv. De suspensies werden na elke behandeling gecentrifugeerd; de afdrukpreparaten werden in de verschillende oplossingen gelegd.

De reactie verliep als volgt:

1) De bacteriën werden gefixeerd in geneutraliseerde 15 % formaline-oplossing en vervolgens

2) gewassen met gedestilleerd water,

3) gedurende 15 minuten gewassen met 2 % natriumbisulfietoplossing om de reductie van het zilveroxyde door andere stoffen te remmen,

4) herhaaldelijk gewassen met gedestilleerd water,

5) gehydrolyseerd in N/1 zoutzuur van 60° gedurende 10 minuten,

6) herhaaldelijk gewassen met tweemaal gedestilleerd water,

7) gedurende 8—12 uur behandeld met alkalische zilveroxyde-oplossing bij 37°, ¹

8) herhaaldelijk gewassen met tweemaal gedestilleerd water,

9) gedurende 1 minuut behandeld met 1 % natriumthiosulfaat-oplossing om het niet gereduceerde zilveroxyde te verwijderen en tenslotte

10) herhaaldelijk gewassen met gedestilleerd water.

Ter contrôle werden telkens bacteriën behandeld met N/1 zoutzuur bij kamertemperatuur.

Resultaten

Ook deze methode had niet de gewenste resultaten. Slechts in enkele bacteriën kwamen spaarzame en over het gehele oppervlak verspreide kleine korrels voor. Een zelfde resultaat zagen wij in alle contrôlepreparaten.

In geen van de met zoutzuur bij 60° C behandelde bacteriën kwamen de door HILLIER c.s. beschreven dichtere gebieden voor.

Dichte poolkorrels werden in geen der gehydrolyseerde bacteriën waargenomen.

Bespreking

De bij de reacties met zilveroxyde-oplossingen opgedane ervaringen zijn in overeenstemming met de mening van GOMORI (1952 - blz. 58), LILLIE (1954 - blz. 158) en VAN DUIJN (1955), die de waarde van deze oplossingen als reagentia op wefselaldehyden, en in het bijzonder op de aldehydegroepen in D.N.Z., zeer laag aanslaan. Wel vermeldde

¹ Deze oplossing werd bereid door 25 cm³ gedestilleerd water te voegen bij

1) 25 cm³ van een mengsel van 100 cm³ 3 % urotropine oplossing en 5 cm³ 5 % zilvernitraatoplossing en

2) 5 cm³ van een mengsel van 100 cm³ 1,9 % boraxoplossing en 10 cm³ 1,44 % boorzuuroplossing.

LILLIE enkele perjoodzuur-Schiff positieve stoffen, waarop een specifieke reactie met alkalische zilveroxyde-oplossing na behandeling met perjoodzuur mogelijk is.

Aangezien de perjoodzuur-Schiff positieve stoffen vrijwel nooit in kernen voorkomen, zou een reactie op deze stoffen met alkalische zilveroxyde-oplossing de kernaequivalenten van tuberkelbacteriën kunnen zichtbaar maken, doordat dan ter plaatse van deze kernaequivalenten geen (of minder) metallisch zilver zou afgezet worden.

Daarom werden de suspensies van 9 en 14 dagen oude cultures van H37Rv resp. R408, en de afdrukpreparaten van 1 maand oude cultures van *M. avium* en H37Rv op soortgelijke wijze als boven beschreven werd, behandeld; met dit verschil echter, dat de hydrolyse in N/1 zoutzuur werd vervangen door de behandeling met perjoodzuuroplossing gedurende 15 minuten bij 37° C, dus volgens DETTMER en SCHWARZ. Contrôlepreparaten werden niet met perjoodzuur behandeld.

Resultaten

Tussen de met perjoodzuur behandelde preparaten en de contrôlepreparaten werden geen verschillen gevonden. In sommige bacteriën kwamen over het gehele oppervlak verspreide, kleine korrels voor. Deze methode had dus niet de gewenste resultaten.

Dat tuberkelbacteriën deze perjoodzuur-Schiff positieve stoffen bevatten, bleek uit de resultaten van de combinatiekleuring, waarna de bacteriën matig roodviolet gekleurd werden.

Ook zonder voorafgaande hydrolyse werden bacteriën uit cultures van de stammen SE en Av, na behandeling met perjoodzuur, met het reagens van Schiff zwak tot matig intensief roodviolet gekleurd.

De contrôlepreparaten voldeden aan de gestelde verwachtingen. In coupes van konijnennieren, die met perjoodzuur behandeld werden, waren vooral de basale membraan, de naar het lumen gekeerde zijde van het tubulusepitheel en de nierkapsel gekleurd. Niet met perjoodzuur behandelde coupes en bacteriepreparaten waren niet gekleurd.

Vele bacteriën in de met perjoodzuur behandelde preparaten waren vrijwel egaal gekleurd. Slechts in een gedeelte der bacteriën konden met moeite enkele iets lichtere plekjes onderscheiden worden. Dit resultaat is dus in overeenstemming met de resultaten der combinatiekleuring, na welke kleuring de kernaequivalenten niet te zien waren.

Of de met perjoodzuur-Schiff positieve stoffen bij tuberkelbacteriën wél in de kern zouden voorkomen, zoals uit het gelijkmatig gekleurd zijn zou kunnen blijken, was echter door de geringe kleurintensiteit niet uit te maken.

Merkwaardig is, dat vooral in jonge cultures (3 en 6 dagen oud) van *M. avium*, minder in de cultures van de stam SE, een gedeelte

der bacteriën intensief gekleurde poolkorrels bevatte. In oudere cultures van *M. avium* waren de polen, vooral de knotsvormige verdikte polen, van de lange draden intensiever gekleurd dan de rest van het bacterielichaam.

Bespreking

Geen van de electronenmicroscopische kleuringen voldeed aan de verwachtingen. Deze resultaten zijn in overëenstemming met de gangbare opvatting betreffende de reactie van alkalische zilveroxyde-oplossingen op weefselaldehyden. Waarschijnlijk zullen de bacteriekernen eerst dan op specifieke wijze met het electronenmicroscop zichtbaar gemaakt kunnen worden, wanneer zware metalen (waarvan de contrast-verhogende werking bekend is) zó aan de specifieke organische kleurstoffen gebonden kunnen worden, dat de eigenschappen van beide componenten behouden blijven.

V

DE WIJZE VAN VERMEERDERING DER MYCOBACTERIËN IN CULTURES

Onderzoek van cultures in de dooierzak van bebroede kippenembryo's met behulp van volgens Ziehl-Neelsen gekleurde preparaten

Zoals eerder vermeld werd, was het uitgangspunt van het onderzoek over de wijze van vermeerdering de beschrijving van LIE, dat hij herhaaldelijk, enkele dagen na inspuiting van suspensies van tuberkelbacteriën in de dooierzak, ophopingen van zuurvaste en niet-zuurvaste korrels vond. Hoewel hij aan deze bevinding geen conclusies verbond ten aanzien van de wijze van vermeerdering van de tuberkelbacterie, meende hij dat met behulp van het electronenmicroscop deze kwestie zou kunnen worden opgelost.

NEDELKOVITSCH (1950), KÖLBEL (1951), ROSENTHAL en HEAGAN (1955) namen op grond van onderzoek van gekleurde preparaten aan, dat de humane tuberkelbacterie een ontwikkelingscyclus kan doorlopen, waarin zuurvaste korrels een bepaald stadium zouden vertegenwoordigen. Op grond van electronenmicroscopisch onderzoek stelden ROSENTHAL en HEAGAN zich voor, dat het cytoplasma zich concentreert in dichte korrels en dat deze korrels scherper begrensd worden terwijl de begrenzingen van de bacteriën vervagen. Vervolgens zouden de korrels uit de bacterie treden en zich tot bacteriën kunnen ontwikkelen. Hoewel zij geen aanwijzingen voor dwarsdeling vonden (evenmin als met behulp van het phasecontrastmicroscop), namen zij aan dat de tuberkelbacterie zich meestal door dwarsdeling vermenigvuldigt.

BRETEY en IMELIK (1949) meenden, eveneens op grond van onderzoek van gekleurde preparaten, dat aviaire tuberkelbacteriën in een bepaald stadium van de groei in zuurvaste korrels kunnen uiteenvallen, die zich tot bacteriën zouden kunnen ontwikkelen. Deze fragmentatie werd ook door BRIEGER en FELL (1946) en BRIEGER en GLAUERT (1952) bij onderzoek van levende microcultures en gekleurde preparaten waargenomen.

Door onderzoek van cultures in de dooierzak met behulp van gekleurde preparaten hebben wij in eerste instantie gepoogd, de waarnemingen van LIE te reproduceren.

Methode. Van cultures in Dubos' vloeibaar medium of van suspensies van tuberkelbacteriën uit cultures op de voedingsbodem van Loewenstein werd 0,1—0,15 cm³ in de dooierzak van 5—6 dagen bebroede

kippenembryo's ingespoten. De suspensies werden verkregen door enkele entnaaldoojjes cultuur in physiologische zoutoplossing te suspenderen. Daarna werd elke suspensie in een parelflesje met de hand geschud tot zij licht troebel was (gedurende 10—15 minuten).

Te beginnen met de eerste dag na inspuiting, werd elke dag één ei geopend. Nadat de dooier in een schaal van Petri gegoten was, werden 2 cm³ hiervan gehomogeniseerd met 10 cm³ van een 2 % teepoloplossing (in gedestilleerd water). Dit mengsel werd gedurende een half uur gecentrifugeerd op 4000 toeren. Van het neergeslagen sediment werden preparaten gemaakt en gekleurd volgens Ziehl-Neelsen.

In totaal werden 15 cultures op deze wijze onderzocht. Voor een overzicht van de onderzochte stammen, de voedingsbodems waarop deze gekweekt waren, de leeftijd dezer cultures en het tijdsverloop gedurende welk de cultures in de dooierzak nagegaan werden, verwijzen wij naar het volgende schema.

Stam	Voedingsbodem	Leeftijd der oorspronkelijke cultuur	Duur van het onderzoek
R408	v. Loewenstein	4 dagen	6 dagen
H37Rv	Vloeibaar Dubos' medium	5 dagen	6 dagen
H37Rv	Vloeibaar Dubos' medium	9 dagen	6 dagen
H37Rv	v. Loewenstein	14 dagen	12 dagen (o)
H37Rv	v. Loewenstein	16 dagen	12 dagen (o)
H37Rv	v. Loewenstein	20 dagen	6 dagen
H37Rv	v. Loewenstein	21 dagen	12 dagen (o)
R408	v. Loewenstein	21 dagen	6 dagen
H37Rv	v. Loewenstein	31 dagen	11 dagen (o)
H37Rv	v. Loewenstein	32 dagen	6 dagen
H37Rv	v. Loewenstein	40 dagen	9 dagen (o)
H37Rv	v. Loewenstein	2 maanden	10 dagen (o)
H37Rv	v. Loewenstein	2 maanden	5 dagen
H37Rv	v. Loewenstein	4 maanden	12 dagen
H37Rv	v. Loewenstein	5 maanden	14 dagen

(o) Deze sedimenten werden gezuiverd om met het electronenmicroscop onderzocht te worden.

Resultaten. In alle volgens Ziehl-Neelsen gekleurde preparaten van deze reeksen werden vrijwel uitsluitend zuurvaste staven gevonden. Steeds lagen deze reeds 5—6 dagen na inspuiting verenigd in compacte strengen. Nagenoeg alle bacteriën waren dan gelijkmatig en intensief zuurvast gekleurd. Vooral in de eerste tijd na inspuiting werden ook kleine zuurvaste staafjes, gelijkmatig minder zuurvast gekleurde bacteriën, in kleine zuurvaste staafjes of korrels gefragmenteerde bacteriën, parelsnoervormen en zuurvaste bacteriën, die zuurvaste of niet-zuurvaste korrels bevatten, gevonden. Slechts enkele vrije zuurvaste korrels

werden gedurende het gehele tijdsverloop der cultures gevonden. In de preparaten, gemaakt van de in te spuiten suspensies, werden slechts weinige vrije zuurvaste korrels gevonden.

Werden de cultures daarentegen in suspensie gebracht op de wijze die LIE aangaf, namelijk door droog verwrijven in een mortier, waarna hieraan physiologische zoutoplossing werd toegevoegd en de aldus verkregen suspensies gedurende een half uur krachtig te schudden in een schudmachine, dan zagen wij geheel andere beelden. Teneinde een duidelijk verschil te zien, werd

- 1) een gedeelte van een één maand oude cultuur van H₃₇Rv voorzichtig gesuspendeerd, door de entnaald uit te schudden in physiologische zoutoplossing en deze suspensie even met de hand te schudden,

- 2) een ander gedeelte van deze cultuur in physiologische zoutoplossing gesuspendeerd, waarna de suspensie in een parelflesje gedurende een half uur met de schudmachine geschud werd,

- 3) een derde gedeelte droog verwreven in een mortier; hieraan werd druppelsgewijze physiologische zoutoplossing onder roeren toegevoegd. Vervolgens werd deze suspensie gedurende een half uur in een parelflesje met de schudmachine geschud.

Tussen de preparaten van deze suspensies werden treffende verschillen waargenomen. In de suspensie gemaakt zoals onder 1) aangegeven werd, vonden wij slechts gelijkmatig en intensief zuurvast gekleurde staven en staafjes. De tweede suspensie bleek ook vele minder zuurvaste staven en verscheidene zuurvaste korrels te bevatten.

In de laatste suspensie kwamen behalve de zuurvaste staven, vele minder en niet-zuurvaste staven voor (welke waarneming in overeenstemming is met de opvatting van YEGIAN en PORTER, 1944, en YEGIAN en KURUNG, 1947, dat trauma een der oorzaken van het verlies der zuurvastheid kan zijn). Tevens werden in deze suspensie vele vrije zuurvaste en niet-zuurvaste korrels gevonden.

De vergelijking van de aldus verkregen suspensies werd twee maal herhaald en wel met twee en drie maanden oude cultures van H₃₇Rv op de voedingsbodem van Loewenstein; beide malen had zij dezelfde resultaten. Werden deze suspensies in de dooierzak van bebroede kippenembryo's ingespoten en werd de groei gedurende 6 dagen met behulp van gekleurde preparaten gevolgd, dan waren de verschillen tussen de preparaten, die van de dooiermassa's uit de verschillende reeksen waren gemaakt, duidelijk.

De dooiermassa's, afkomstig van de eieren, besmet met de eerste suspensie, bevatten slechts enkele zuurvaste korrels. In de dooier, besmet met de tweede suspensie, waren vele zuurvaste en niet-zuurvaste korrels te vinden, maar ophopingen van deze korrels en niet-zuurvaste staven werden slechts gevonden in de dooiers die besmet waren met de suspensie, bereid door verwrijven en schudden.

Ook deze proef werd tweemaal herhaald, beide malen met hetzelfde resultaat.

De meest waarschijnlijke verklaring voor de door LIE gevonden op-hopingen van korrels lijkt ons, dat het ontstaan van deze korrels een gevolg is van de wijze, waarop de suspensie bereid wordt.

Onderzoek van cultures met behulp van het electronenmicroscop

Inleiding. Hoewel de meeste onderzoekers geen delingsfiguren konden vinden, werd dwarsdeling als de meest voorkomende vorm van vermeerdering door allen, met uitzondering van XALABARDER, aanvaard.

BASSERMANN (1954) meende, dat lengtedeling zeker voorkomt. Volgens WERNER (1951) is de mogelijkheid, dat lengtedeling een enkele maal voorkomt, niet uitgesloten.

Ook op grond van electronenmicroscopisch onderzoek heeft men verschillende hypothesen opgesteld over het bestaan en het verloop van een ontwikkelingscyclus van de tuberkelbacterie. De opvattingen van WESSEL (vorming van sporiden) en ROSENTHAL en HEAGAN (concentratie van het cytoplasma en uittreden van de aldus gevormde korrels) werden reeds beschreven.

ALEXANDER-JACKSON (1945) vond zowel in gekleurde als in electronenmicroscopisch onderzochte preparaten kleine korrels, die in amorphe massa's bij elkaar lagen. In navolging van MALASSEZ en VIGNAL sprak zij van „zoögloeale vormen”, die zich volgens haar echter wel tot bacteriën kunnen ontwikkelen.

LEMBKE (1947) zag staafjesvormen van 0,15—0,2 μ lengte, die uit de bacteriën zouden groeien en zich van deze zouden scheiden, wanneer zij een bepaalde lengte bereikten, en die zich dan tot volwassen bacteriën zouden ontwikkelen.

MALFATTI (1949) beschreef de korreltjes, die hij in lange bacteriën vond, als zeer kleine sporen, die uit het bacterielichaam zouden kunnen treden en zich daarna zouden kunnen ontwikkelen tot bacteriën. Evenals de staafjesvormen die LEMBKE vond, zouden deze sporen filtreerbaar zijn.

Volgens BASSERMANN (1955) zouden bij autolysis van de cultures L-vormen voorkomen. In de bacteriën uit deze cultures zouden vele vacuolen aanwezig zijn. Deze vacuolen zouden zo groot kunnen worden, dat zij de bacteriewand doen barsten. De L-vormen, blazig van vorm en zeer onregelmatig gevormde poolkorrels bezittend, zouden dan vrijkomen. Zij zouden te kweken zijn op kunstmatige voedingsbodems. Een gedeelte van deze L-vormen zou filtreerbaar zijn.

XALABARDER (1953) meende, dat de tuberkelbacterie een cyclus doorloopt die begint met filtreerbare virusdeeltjes. Deze virusdeeltjes zouden zich ontwikkelen tot L-vormen, welke op hun beurt cysten zouden vormen, waarin de jonge bacteriën zich zouden ontwikkelen.

Ook door middel van vertakking zouden de tuberkelbacteriën zich kunnen vermeerderen. In een dergelijk mycelium, zou de vermeerdering plaats hebben door middel van hyphen en conidiën. De uit dit mycelium ontstane bacteriën zouden chlamydosporen en ook echte sporen kunnen vormen.

Hoewel alle bovengenoemde opvattingen betrekking hebben op humane tuberkelbacteriën en de preparaten door al deze onderzoekers op dezelfde wijze gemaakt werden, nl. door drogen van de suspensiedruppels op de objectdragers, zijn de waarnemingen, waarop deze opvattingen steunen, niet met elkaar in overeenstemming. De mogelijkheid is niet uitgesloten, dat er verschil bestaat in de wijze, waarop de te onderzoeken cultures in suspensie werden gebracht. Zowel XALABARDER als MALFATTI gaven aan, dat de suspensies geschud werden (met een „vibrator” resp. in een parelflesje met een schudmachine) een behandeling, die grove (reeds lichtmicroscopisch waarneembare) artefacten ten gevolge heeft (waarop LEPINE, 1955, reeds wees met betrekking tot de door XALABARDER gepubliceerde afbeeldingen) zoals lege of nagenoeg lege bacteriewanden, waarin nog enkele cytoplasmadeeltjes voorkomen of fijngekorrelde bacteriën. (De wijze van suspenderen bij de andere onderzoeken is niet bekend.)

Ook is het mogelijk, dat verontreinigende deeltjes uit de voedingsbodem als virusdeeltjes of sporen geïnterpreteerd werden, omdat de als zodanig geïnterpreteerde deeltjes zeer onregelmatig van vorm en verschillend van afmetingen zijn.

De meeste opvattingen over een ontwikkelingscyclus zijn gebaseerd op waarnemingen van één verschijningsvorm (WESSEL, ALEXANDER-JACKSON) of een bepaalde morphologische betrekking tussen twee beelden (MALFATTI, BASSERMANN). (Bij de publicatie van LEMBKE werden geen afbeeldingen gevoegd, zodat hierover geen oordeel mogelijk is.)

De verschillen in waarnemingen, gevoegd bij het feit, dat geen der onderzoekers, met uitzondering van BASSERMANN, delingsfiguren heeft gevonden, doen veronderstellen, dat telkens een te gering aantal waarnemingen werd verricht. Nu zijn o.m. het kleine oppervlak van het preparaat en de reeds volkomen ondoordringbaarheid voor electronen van zelfs betrekkelijk kleine bacteriestrengen de oorzaak, dat slechts een fractie van het aantal waarnemingen, dat in dezelfde tijd met het lichtmicroscop gedaan zou kunnen worden, mogelijk is. Wil men echter een bepaalde wetmatigheid in de verandering der bacteriën tijdens de groei der cultuur ontdekken, dan wordt het aantal der waarnemingen beslissend, aangezien continue observatie van het levende object met het electronenmicroscop door de bestraling met electronen, de hierdoor ontwikkelde warmte en het hiervoor vereiste vacuum onmogelijk is.

Gelijkstelling van gevonden afwijkende vormen met elementen, die zich tot bacteriën kunnen ontwikkelen mag eerst geschieden, wanneer ook tussenvormen uit een zodanige ontwikkeling gevonden worden in preparaten van een en dezelfde voedingsbodem en volgens dezelfde methode bereid, in de volgorde van tijd waarin zulke ontwikkeling plaats zou hebben. De resultaten van een dergelijk onderzoek moeten op een daarvan onafhankelijke wijze gecontroleerd worden, bijv. door kweek- en dierproeven. De methode volgens welke de preparaten gemaakt worden, moet zo weinig mogelijk artefacten tengevolge hebben.

De wijze van vermeerdering trachtten wij met het electronen-microscop na te gaan, door tijdens de groei van cultures van verschillende stammen en types van Mycobacteriën met kleine tijdsintervallen preparaten van deze cultures te onderzoeken. Voorts werden diverse preparaten onderzocht, die van verschillende cultures van uiteen lopende leeftijd gemaakt werden. In het bijzonder werd nagegaan of in deze cultures vormen voorkwamen, die van het reeds beschreven beeld van de bacterie afweken en of door waarneming van opeenvolgende stadia tussen de afwijkende elementen en de bacteriën de conclusie, dat er een ontwikkelingscyclus van de tuberkelbacterie bestaat, gerechtvaardigd is. Tevens werd de verandering van de vorm en de structuur der bacteriën met het ouder worden der cultuur nagegaan.

Enkele malen werd de groei van cultures van H37Rv en M. phlei ook nagegaan met het phasecontrastmicroscop.

Filtraten van enkele cultuursuspensies werden met kweekproef en dierproef op het voorkomen van filtreerbare vormen onderzocht.

Beschrijvingen der electronenmicroscopisch onderzochte cultures

Cultures van H37Rv in de dooierzak van bebroede kippenembryo's

Voordat electronenmicroscopisch te onderzoeken preparaten gemaakt werden, werd het sediment, waarvan een gedeelte volgens Ziehl-Neelsen gekleurd was, alsmede een op gelijke wijze verkregen sediment van de dooier van een niet besmet ei, één-maal met een 1,5 % natronloog oplossing en herhaaldelijk met physiologische zoutoplossing gewassen (telkens gedurende een half uur op 4000 toeren). Het laatste sediment werd geresuspendeerd in physiologische zoutoplossing. Van deze suspensies werden kleine druppels op de objectdragers gelegd. Deze werden gedurende 3 minuten gefixeerd in 1 % osmiumtetroxyde damp, gedroogd, gespoeld in gedestilleerd water en vervolgens weer gedroogd. Ook van deze suspensies werden preparaten gekleurd volgens Ziehl-Neelsen. In enkele preparaten werden enige vrije zuurvaste korrels gevonden.

Resultaten. Gedurende de eerste 4—5 dagen na inspuiting werd steeds een polymorph beeld gevonden. Kleine bacteriën met coccoïde

vorm en poolkapjes kwamen voor, evenals lange bacteriën. Deze laatste hadden homogeen cytoplasma of waren verdeeld in dichte en minder dichte gedeelten. Bij enkele van deze waren de minder dichte gebieden ovaal of rond, bij andere was het cytoplasma verdeeld in ongelijke delen door overdwars lopende, zeer dichte banden. Van andere bacteriën was de vorm geheel of voor een gedeelte onregelmatig met talrijke knoopvormige verdikkingen.

Na ongeveer 5 dagen was het beeld meer eenvormig. De bacteriën waren dan voor het merendeel vrij lang en lagen in kleine of grote strengen verenigd. Hun cytoplasma was regelmatig verdeeld in vaag begrensde dichtere en transparantere gedeelten. Na 7—8 dagen bevatten de meeste bacteriën ovale of ronde, vaag of scherp begrensde minder dichte plekjes (2—4 per bacterie). Van andere bacteriën was het cytoplasma homogeen. Dit uniforme beeld konden wij steeds tot het einde van de waarnemingstijd vinden. Enkele coccoïde staafjes en onregelmatig gevormde lange bacteriën werden dan nog gevonden.

In andere reeksen werd het sediment, nadat het enkele malen met physiologische zoutoplossing en éénmaal met natronloogoplossing gewassen was, éénmaal met 0,1 % osmiumtetroxyde-oplossing en éénmaal met gedestilleerd water gewassen (telkens door centrifugatie gedurende een half uur op 4000 toeren). Het sediment werd daarna geresuspendeerd in gedestilleerd water. Hiervan werden preparaten gemaakt, door kleine druppels op de objectdragers te leggen en deze te drogen bij 60° C. Ook van deze suspensies werden preparaten gekleurd volgens Ziehl-Neelsen. Vrije korrels werden in deze preparaten niet gevonden.

Resultaten. Hoewel het cytoplasma van de bacteriën in deze preparaten dichter was dan het cytoplasma van de bacteriën in de met osmiumtetroxydedamp gefixeerde preparaten, was de verandering van het beeld der cultures waarvan de preparaten op verschillende wijze gefixeerd waren, in grote trekken gelijk.

Het cytoplasma van deze bacteriën was dichter door het intensiever fixeren. (Dit verschil tussen lang en kort gefixeerde bacteriën werd ook gevonden in aldus behandelde preparaten van 8 en 13 dagen oude cultures van H37Rv op Dubos' agar.) Ook van deze cultures was het beeld in de eerste dagen na inspuiting pleomorph. Lange bacteriën, waarin een dichte streng met talrijke verdikkingen en insnoeringen van pool tot pool liep, bacteriën met knoopvormige verdikkingen of met uitbochtungen van de bacteriewand werden gevonden evenals staven met homogeen cytoplasma en kleine coccoïde bacteriën met poolkapjes. (Fig. 14.) Naarmate deze cultures ouder werden, kwamen er meer bacteriën met gelijkmatig dicht cytoplasma voor. Later (6—7 dagen na enting) lagen deze in strengen verenigd. In enkele van deze bacteriën kwamen ronde of ovale, vaag begrensde, transpa-

rante plekken voor. Vele bacteriën bevatten bij de polen of bij het centrum dichtere plekken.

In geen van deze preparaten werden, met uitzondering van de tuberkelbacteriën, elementen gevonden, die niet in de preparaten, gemaakt van niet-besmette dooier, voorkwamen. Hoewel van elk sediment vele preparaten onderzocht werden, vonden wij in het begin van de kweekperiode slechts weinig bacteriën. Daardoor was het niet mogelijk een duidelijk beeld van de ontwikkeling van deze cultures te verkrijgen.

In deze preparaten werden geen delingsfiguren waargenomen. De misvormde bacteriën, die in het begin van de kweekperiode gevonden werden en sterk afweken van het beeld dat bij de bespreking van de structuur beschreven werd, werden in de cultures op andere voedingsbodems vrijwel niet gevonden. Spoelen van afdrukpreparaten van cultures van H37Rv op Dubos' agar in 1,5 % natronloogoplossing en/of in 2 % teepoloplossing (in een van beide of in beide oplossingen gedurende een half uur) had geen zichtbare beschadiging van de bacteriën tengevolge. De aanwezigheid van dergelijke vormen zou verklaard kunnen worden, door aan te nemen dat een gedeelte van de bacteriën tijdens het schudden van de in te spuiten suspensie in een parelflesje en het veelvuldig centrifugeren beschadigd werd. In preparaten van 2 maanden oude cultures van H37Rv die, na suspenderen in physiologische zoutoplossing, gedurende 10 minuten in een parelflesje geschud waren, werden ook dergelijke vormen gevonden.

Cultuur van H37Rv in Friedmann's medium

Eénmaal werd de stam H37Rv gekweekt in Friedmann's medium (een suspensie van 4 % kippenembryo-extract in Tyrode-oplossing waaraan 500 E penicilline per 25 cm³ werden toegevoegd).

Elke dag, te beginnen met de eerste dag na enting, werd een cultuurbuisje gedurende een half uur op 4000 toeren gecentrifugeerd. Het sediment werd geresuspendeerd in physiologische zoutoplossing. Hier van werden preparaten gemaakt, door kleine druppels op de objectdragers te leggen, ze te fixeren in 1 % osmiumtetroxydedamp en te drogen. Daarna werden ze gespoeld in gedestilleerd water.

Van elk sediment werden tevens preparaten ter kleuring volgens Ziehl-Neelsen gemaakt. In sommige van deze gekleurde preparaten werden enkele vrije zuurvaste korrels gevonden. De bacteriën waren één dag na enting minder zuurvast, later gelijkmatig en intensief zuurvast gekleurd. Reeds 3 dagen na enting was er beginnende ketenvorming te zien.

In de met het electronenmicroscop onderzochte preparaten werden voor het merendeel 2—3 μ lange bacteriën met homogeen cytoplasma gevonden. Slechts enkele coccoïde vormen van ongeveer 0,8 μ lengte

kwamen twee dagen na enting voor. Vier dagen na enting lagen de bacteriën in kleine, later in grotere strengen gegroepeerd. In enige van deze strengen kwamen bacteriën voor, die twee tot vier scherp of vaag begrensde ronde, of ovale, transparante plekken bevatten.

In deze cultuur die tot 20 dagen na enting nagegaan werd, vonden wij geen directe aanwijzingen voor vermeerdering door dwarsdeling. Wel werden enkele bacterieparen in V-rangschikking gevonden. Hoe deze ligging ontstaan was, kon bij deze bacteriën niet waargenomen worden. Andere vormen dan bacteriën werden niet gevonden.

Cultures van de stam H37Rv op voedingsbodems van Loewenstein

Van een cultuur op de voedingsbodem van Loewenstein werden elke dag, te beginnen met de 7e dag na enting, preparaten gemaakt, door een weinig van de cultuur af te strijken en dit te suspenderen in physiologische zoutoplossing. Van deze suspensie werden kleine druppels op de objectdragers gelegd, gedurende 3 minuten gefixeerd in 1 % osmiumtetroxydedamp en daarna gedroogd. Vervolgens werden de preparaten gespoeld in gedestilleerd water.

In de volgens Ziehl-Neelsen gekleurde preparaten werden vrijwel uitsluitend gelijkmatig en intensief gekleurde zuurvaste staven gevonden. Slechts enkele staven met zuurvaste korrels kwamen in deze preparaten voor. Vrije zuurvaste korrels werden niet gevonden.

Van de 7e tot en met de 10e dag na enting werden in de electronen-microscopisch onderzochte preparaten uitsluitend staven gevonden met homogeen en vrij dicht cytoplasma. Deze bacteriën lagen geïsoleerd of in kleine strengen gegroepeerd. In enkele strengen bevatten vele bacteriën zeer kleine korrels of dichte plekjes aan de polen.

Van de 10e tot en met de 16e dag werden, behalve deze staven, ook bacteriën met transparant cytoplasma en vrij grote, iets dichtere, poolkapjes gevonden. Slechts in enkele van deze staven waren grote en dichte korrels te zien.

Na 22 dagen kwamen nog beide vormen van bacteriën voor. Bij sommige bacteriën waren de plekjes bij de polen scherper begrensd en dichter. Bij een enkele bacterie promineerde een dichte „korrel” buiten het lichaam.

Na 35 en 64 dagen werd de cultuur nogmaals onderzocht. Voor het merendeel werden dezelfde vormen gevonden. Voorts kwamen kleine staafjes met transparant cytoplasma en dichte polen voor en lange staven, waarin het cytoplasma verdeeld was in onscherp en onregelmatig begrensde, grote, dichtere en transparantere gebieden.

Enkele malen werd in deze cultuur een insnoering in of bij het centrum van 'n bacterie gevonden. Bij enige van deze bacteriën kwam ter plaatse van de insnoering een dichte plek voor, die eveneens ingesnoerd was.

Behalve de bacteriën werden in bepaalde preparaten enkele gelijk-

matig dichte massa's gevonden, waarvan sommige nog de bacterievorm hadden behouden en waarvan de periferie rafelig was. Andere vormen kwamen in deze cultuur niet voor.

Van een andere cultuur — verkregen door overenting van een 12 dagen oude cultuur op de voedingsbodem van Loewenstein — werden iedere dag, te beginnen met de tweede dag na enting, preparaten gemaakt, door de cultuur op formvarvliezen af te drukken. Daarna werden de preparaten gefixeerd in 1 % osmiumtetroxyde-damp en gedroogd. Vervolgens werd een gedeelte der preparaten in gedestilleerd water gespoeld en daarna gedroogd; een ander gedeelte werd niet gespoeld in gedestilleerd water.

Twee dagen na enting lagen de meeste bacteriën in kleine groepjes of in ketentjes van 3—6 bij elkaar. Van bijna al deze staafjes was het cytoplasma homogeen en nogal dicht. Bij sommige kwamen vaag begrensde, ronde, dichtere plekjes aan de polen voor; in enkele andere werden daarentegen niet scherp begrensde, kleine, ovale, transparante plekjes bij de polen gevonden. Sommige bacteriën waren in of bij het midden ingesnoerd. Van geïsoleerd liggende staven was het cytoplasma homogeen of in onregelmatig verspreide, vaag begrensde, dichtere en transparantere plekken gedifferentieerd. Dit laatste was ook het geval bij enkele, in ketentjes liggende bacteriën.

Tijdens de volgende dagen veranderde het beeld nauwelijks. Wel bleken de strengen groter te zijn. Tal van ingesnoerde bacteriën werden gevonden. Vier dagen na enting werd een bacterie gevonden die in vorm leek op de bacteriën, gekweekt in de dooierzak: een zeer lange staaf (9 μ lang) waarin een ongeveer 3 μ lange, onregelmatig gevormde streng lag, die aan een zijde abrupt ophield en aan de andere zijde overging in een gebied waar het cytoplasma in dichtere en minder dichte, vaag begrensde plekjes gedifferentieerd was.

Zes en 7 dagen na enting waren enkele strengen opgebouwd uit bacteriën, waarvan het cytoplasma vele ronde, ovale of onregelmatig gevormde, vrij vaag begrensde, dichte plekjes bevatten. De meeste strengen bevatten echter nog bacteriën met gelijkmatig dicht cytoplasma. In enkele staven kwamen vrij kleine (tot 0,1 μ grote) korrels voor die bij de polen lagen.

Grote korrels werden slechts 8 dagen na enting gevonden in sommige bacteriën. (Fig. 15.)

Tien dagen na enting was het beeld bijna niet veranderd. De bacteriën lagen in grote strengen gegroepeerd en bevatten homogeen cytoplasma. Geïsoleerd liggende bacteriën hadden een gedifferentieerd cytoplasma. Na 11 dagen bleek de cultuur door schimmel verontreinigd te zijn.

Herhaaldelijk werden beginnende tot reeds voltooide dwarsdelingen gevonden. Losse korrels werden niet gevonden. Wel kwamen 7 en

10 dagen na enting enkele gelijkmatig dichte, vaag begrensde, vrijwel amorphe cytoplasma-massa's voor.

Verscheidene cultures van H37Rv van verschillende leeftijd op de voedingsbodem van Loewenstein werden onderzocht, door materiaal van de cultuur af te strijken en dit te suspenderen in physiologische zoutoplossing. Van deze suspensie werden kleine druppels op de objectdragers gelegd. De preparaten werden gedurende 3 minuten gefixeerd in osmiumtetroxydedamp, gedroogd, gespoeld in gedestilleerd water en opnieuw gedroogd.

In 30 cultures, die gedurende 24 uur bebroed waren, konden, behalve bacteriën, geen vormen gevonden worden, die niet in preparaten, op dezelfde wijze gemaakt van het oppervlak van niet beënte voedingsbodems, voorkwamen. Ditzelfde resultaat werd verkregen bij onderzoek van 10 cultures, die gedurende 2 resp. 3 dagen bebroed waren.

Slechts 2—3 μ lange bacteriën met homogeen en dicht cytoplasma werden in enkele preparaten gevonden. Ook in verscheidene preparaten, gemaakt van cultures, die 2—6 maanden bebroed waren, werden geen andere vormen dan bacteriën gevonden. In de 2 en 3 maanden oude cultures kwam nog een groot aantal lange en homogene bacteriën voor. In de cultures ouder dan 3 maanden, kwamen voor het merendeel kleine staafjes voor met dichtere poolkapsjes. In enkele van deze was een zeer dichte plek aan één pool door een insnoering van de rest van het bacteriële lichaam gescheiden. Lange en homogene bacteriën werden echter nog gevonden.

Cultures van de stam H37Rv op Dubos' agar

De groei van vier cultures van de stam H37Rv op Dubos' agar werd nagegaan door, te beginnen met de eerste dag na enting, elke dag afdrukpreparaten er van te maken.

Een gedeelte van deze preparaten werd eerst gedroogd en daarna gedurende 3 minuten in 1 % osmiumtetroxydedamp gefixeerd, een ander gedeelte werd eerst gefixeerd en vervolgens gedroogd. Een deel der preparaten werd gespoeld in gedestilleerd water en wederom gedroogd.

De oorspronkelijke cultures op de voedingsbodems van Loewenstein, waarvan op Dubos' agar overgeënt werd, waren resp. 1, 2, 2½ en 4 maanden oud.

In de ontwikkeling der onderscheiden cultures werd nagenoeg geen verschil waargenomen. Eén cultuur werd tot 2 maanden na enting vervolgd, in de andere werd de groei tot de 30ste dag na enting nagegaan.

In alle cultures kwamen tot ongeveer een maand na enting slechts staafvormige bacteriën voor, met vrijwel homogeen cytoplasma. Ook na dit tijdstip werden voor het merendeel staven met homogeen cytoplasma gevonden.

De gemiddelde lengte van de staven nam gedurende de eerste drie tot vier dagen toe, bleef daarna gedurende ongeveer zeven dagen gelijk en nam vervolgens iets af, om voor de rest van de observatietijd vrijwel stationnair te blijven. Tot het einde (60 dagen na enting) wisselde de individuele lengte der bacteriën sterk. In het centrum der strengen werden dan staafjes van ongeveer $1,5\ \mu$ gevonden, terwijl aan de periferie de staven een lengte van $3-4\ \mu$ hadden.

Reeds na twee dagen lagen de bacteriën in kleine strengetjes, die later gestadig in omvang toenamen. Figuren van dwarsdeling, beginnende tot reeds voltooide insnoeringen, kwamen het meest frequent voor tijdens de eerste 10 dagen na enting, maar werden gedurende de gehele waarnemingstijd gevonden. Paren van bacteriën, die in V-rangschikking lagen, kwamen weinig voor. Niet zelden werden bacteriën gevonden, die voor een gedeelte langs elkaar geschoven lagen.

Behalve homogene en vrij dichte staven, kwamen vrijwel gedurende de gehele observatietijd bacteriën voor, waarin regelmatig gerangschikt, één tot vier ronde plekken werden gevonden, die iets minder dicht waren dan het overige cytoplasma. Van 5—9 dagen na enting werden enkele bacteriën met scherp begrensde vacuolen gevonden. Behalve deze dichte staven kwamen in alle preparaten transparante staven voor, die in dichtheid nauwelijks verschilden van het formvarvlies. Sommige strengen waren geheel uit deze transparante bacteriën opgebouwd. Enkele strengen, bestaande uit dichte staven (zoals op de 11e dag na enting) hadden een uitloper, die opgebouwd was uit homogene en transparante bacteriën. (Fig. 11.)

Vele transparante staven bevatten talrijke, iets dichtere, stipvormige korrels, andere waren van kleine poolkorrels voorzien. In de dichtere staven kwamen bij de polen kleine, ronde of ovale, vaag begrensde plekjes voor die iets dichter waren dan het cytoplasma.

Geïsoleerd liggende bacteriën hadden soms afwijkende vormen: zij waren klein, ovaal of peervormig, met poolkapjes of hadden aan één pool een zeer dichte ronde plek, die door een insnoering van het overige bacterielichaam gescheiden was. Andere bacteriën waren lang, en hadden vorm en structuur zoals de in de strengen liggende bacteriën, of hun cytoplasma tussen twee dichte polen was vlekkelig gedifferentieerd.

Na een maand werden steeds meer staven vlekkelig gedifferentieerd. De poolkapjes van deze staven werden dichter. Soms waren zij zo dicht en rond, dat zij op korrels leken. Na ongeveer 50 dagen waren enkele strengen vrijwel geheel op deze wijze veranderd. In deze strengen waren enige bacteriën gelyseerd. Enkele andere bacteriën waren onveranderd, de meeste echter toonden een onregelmatige rangschikking van wazige, iets dichtere plekken, met zeer dichte poolkapjes of ronde plekken aan de polen.

Andere vormen, zoals vrije korrels of amorphemassa's, werden in deze cultures niet gevonden.

In deze cultures werden slechts aanwijzingen voor vermeerdering door dwarsdeling gevonden. Herhaaldelijk zagen wij beginnende tot reeds voltooide insnoeringen. (Fig. 16.) In enige strengen bleken de bacteriën te degenereren. Beginnende lysis werd in deze strengen waargenomen.

Van een andere cultuur van H₃₇Rv werden vier maanden na enting nogmaals afdrukpreparaten gemaakt. Sommige strengen waren voor een groot gedeelte tot lysis overgegaan. In deze strengen werden nog enige lange homogene en vrij dichte bacteriën gevonden. Andere bacteriën waren nog als vlekkelig gedifferentieerde staafjes met zeer dichte polen, of als geheel transparante vormen, al of niet met dichte polen te zien. (Fig. 17.) Tussen deze vormen lag een wazige en schimmige, vrijwel homogene massa met enige korrels.

In de — volgens Ziehl-Neelsen — gekleurde preparaten van deze laatste cultuur werden intensief zuurvast gekleurde lange en korte bacteriën, minder zuurvaste en niet-zuurvaste staafjes, en niet-zuurvaste intensief blauw gekleurde korrels, geïsoleerd of in lichtblauw gekleurde veldjes liggend, gevonden.

In 4 en 6 dagen oude cultures van H₃₇Rv in Dubos' vloeibaar medium, waarvan de preparaten op dezelfde wijze gemaakt werden als van cultures in Friedmann's medium, werden slechts homogene 2—3 μ lange bacteriën gevonden, die in compacte kleine strengen gegroepeerd lagen.

Cultures van de humane stammen SE, BE en R₄₀₈ op Dubos' agar

Van cultures van de stammen SE, BE en R₄₀₈ op Dubos' agar werden, te beginnen met de eerste dag na enting, om de twee tot vier dagen afdrukpreparaten gemaakt. De preparaten werden gedroogd, gefixeerd in 1 % osmiumtetroxydedamp gedurende 3 minuten, gespoeld in gedistilleerd water en tenslotte weer gedroogd. De oorspronkelijke cultures der stammen op de voedingsbodems van Loewenstein, waarvan op Dubos' agar overgeënt werd, waren alle even oud (4 maanden).

Daar het beeld van deze cultures tijdens de groei vrijwel gelijkvormig bleef, zal met één beschrijving volstaan worden. Waar nodig, zal het verschil aangegeven worden.

Eén dag na enting werden kleine staafjes gevonden, waarvan het cytoplasma homogeen was en dichte poolkorrels bevatte. Sommige van deze ongeveer 1 μ lange staafjes lagen naast, of in grote of kleine gelijkmatig dichte, vormeloze massa's.

Na 3 dagen kwamen vooral in paren liggende, 2—3 μ lange staven voor met grote korrels. Het cytoplasma van de meeste van deze staven was homogeen. In enkele andere staven werden een of twee vaag be-

grensde ovale plekken gevonden, die transparanter waren dan het overige cytoplasma. De meeste bacterieparen vormden hoeken, in enkele paren lagen de bacteriën voor een gedeelte langs elkaar geschoven. Enkele naast de bacteriën of geïsoleerd liggende amorphe en gelijkmatig dichte massa's werden gevonden.

Van 4 tot 6 dagen na enting kwamen kleine en grote, meestal compacte strengen voor, samengesteld uit 2—4 μ lange bacteriën. Het cytoplasma van de meeste staven was homogeen of bevatte vele vacuolen. (Fig. 8.) Bij de polen van vrijwel alle staven lagen dichte korrels. Lagen de korrels dichter bij het centrum, dan kwamen in de polen kleine, vaag begrensde, dichte plekjes voor. In enkele andere staven was het cytoplasma op enkele brokstukjes na verdwenen, in weer andere, evenals in enkele geïsoleerd liggende bacteriën, had het cytoplasma zich gedifferentieerd tot een onregelmatige en vlekkelijke rangschikking van vaag begrensde, dichtere en transparantere plekjes. Vormloze en gelijkmatig dichte massa's, sommige met dichte korrels, kwamen in alle cultures voor. In de cultuur van de stam BE kwamen éénmaal in zulk een amorphe massa enkele vrijwel ronde transparante vormsels voor, 1 μ groot, waarvan één een dicht plekje aan een der polen bevatte. Enkele vrije ronde of ovale korrels kwamen in alle cultures voor, doch werden vooral in de cultuur van de stam SE gevonden. (Fig. 1.)

Negen dagen na enting kwamen grote strengen van homogene, vrij dichte of meer transparante, 1—3 μ lange staven voor. Bijna alle bacteriën bevatten duidelijke en grote poolkorrels. Geïsoleerd liggende bacteriën waren lang en vlekkelig gedifferentieerd, of ovaal van vorm met vaag begrensde dichte poolkapjes.

Dertien tot 16 dagen na enting werden grote strengen gevonden, waarin kleine (ongeveer 1 μ) en grote staven (tot 3 μ) naast elkaar voorkwamen. Het cytoplasma van deze staven was homogeen, maar varieerde in dichtheid. In enkele staven waren de poolkorrels onregelmatig gevormd of minder dicht.

Enkele homogene vormloze massa's werden gevonden, waarvan sommige korrels of iets dichtere plekjes bevatten.

Na de 20ste dag werden steeds meer kleine ovale staafjes (van 1—2 μ lengte) gevonden. In sommige strengen bevatten de meeste staafjes nog duidelijke ovale of ronde poolkorrels. In andere strengen werden staafjes met zeer grote prominente korrels waargenomen; andere korrels in deze strengen waren onregelmatig van vorm en minder dicht geworden of in kleine fragmenten uiteengevallen. Van enkele korrels was nog slechts de rand zichtbaar. (Fig. 5.)

Van sommige staafjes waren de begrenzingen vervaagd, van enkele andere was het cytoplasma vlekkelig gedifferentieerd.

Vooral van 4 tot 9 dagen na enting werden vele beginnende tot vol-

50

toode figuren van dwarsdeling gevonden, waarbij de bacteriën in of bij het centrum ingesnoerd waren. Vrije korrels werden niet zelden waargenomen. Deze korrels kwamen wat betreft hun vorm en hun afmetingen overeen met de korrels in de bacteriën. De meeste vrije korrels werden door intensieve blootstelling aan electronen op dezelfde wijze veranderd als de korrels in de bacteriën. Waarschijnlijk zijn de geïsoleerd liggende korrels derhalve identiek met de korrels in de bacteriën.

Herhaaldelijk werd een vrijwel vormloze, vaag of rafelig begrensde, gelyseerde bacteriemassa aangetroffen. In enkele van deze massa's kwamen dichte korrels of dichte vaag begrensde plekjes voor.

In enkele strengetjes kwamen bacteriën voor, waarvan het cytoplasma geheel of vrijwel geheel verdwenen was en waarvan slechts de wand was overgebleven.

Van een overeenkomstige cultuur van de stam SE op Dubos' agar werden preparaten voor kleuring volgens Ziehl-Neelsen gemaakt door stukjes uit de voedingsbodem te snijden, deze te fixeren in 1 % osmiumtetroxydedamp gedurende 3 minuten en ze vervolgens op objectglazen te deppen. In al deze preparaten werden vrijwel uitsluitend gelijkmatig en intensief zuurvaste gekleurde bacteriën gevonden. Van de 3e tot de 13e dag na enting werden de strengetjes waarin de bacteriën gegroepeerd lagen, steeds groter. Vooral na de 20e dag na enting werden strengen met enkele minder en niet-zuurvaste staafjes gevonden, evenals geïsoleerd of in groepjes liggende diepblauwe korrels, waarvan sommige met niet-zuurvaste staafjes verbonden waren.

Geïsoleerd liggende, zuurvaste staafjes kwamen in alle preparaten voor.

Van de oorspronkelijke, 4 maanden oude cultures van deze stammen op de voedingsbodem van Loewenstein werden preparaten gemaakt, door een gedeelte der cultures te suspenderen in physiologische zoutoplossing. Van deze suspensies werden kleine druppels op de objectdragers gelegd. Deze preparaten werden gefixeerd in 1 % osmiumtetroxyde damp gedurende 3 minuten, gedroogd, gespoeld in gedestilleerd water en wederom gedroogd.

In deze preparaten werden kleine, voor het merendeel ovale staafjes gevonden met homogeen cytoplasma en iets dichtere poolkapjes. Enkele bacteriën bevatten een of twee dichte korrels.

Cultures van M. phlei op Dubos' agar en op de voedingsbodem van Loewenstein

Van een cultuur van *M. phlei* op Dubos' agar werden, te beginnen met 3 uur na enting, afdrukpreparaten gemaakt. De preparaten werden gedroogd en vervolgens gedurende 3 minuten in 1 % osmiumtetroxydedamp gefixeerd.

De oorspronkelijke cultuur op de voedingsbodem van Loewenstein waarvan op Dubos' agar werd overgeënt, was 1 maand oud.

Drie uur na enting werden ovale tot ronde, $0,5-1\ \mu$ grote staafjes gevonden, waarvan sommige één, enkele twee grote, dichte poolkorrels bevatten. (Fig. 18.)

Vaak lagen deze staafjes naast een vrijwel gelijkmatig dichte massa, die vaag begrensd was, maar soms nog een ovale vorm had.

Na zes uur werden soortgelijke staafjes gevonden, die ook weer naast een vrijwel amorphe massa lagen. Ook kwamen $2-3\ \mu$ lange staven voor, waarvan enkele bestonden uit een ovaal centrum met een of twee minder brede uitlopers. Deze staven bevatten twee of meer dichte korrels. (Fig. 19.)

Achtien uur later kwamen vrijwel uitsluitend $1,5$ tot $3\ \mu$ lange, over de hele lengte even brede staven voor, die geen dichte korrels bevatten; slechts enkele lange staven hadden nog een of twee poolkorrels. Vele figuren van dwarsdeling werden gevonden. In sommige staven kwamen een of twee vaag begrensde, ovale tot ronde plekken voor, die transparanter waren dan het overige cytoplasma.

Twee dagen na enting werden vooral kleine, ongeveer $1\ \mu$ lange staafjes gevonden. Enkele langere staven kwamen nog voor, evenals amorphe en gelijkmatig dichte massa's.

Van een cultuur van *M. phlei* op de voedingsbodem van Loewenstein werden één dag na enting preparaten gemaakt, door een gedeelte der cultuur te suspenderen in physiologische zoutoplossing. Van deze suspensie werden kleine druppels op de objectdragers gelegd. De preparaten werden gedurende 3 minuten in 1 % osmiumtetroxyde-damp gefixeerd en vervolgens gedroogd. Daarna werden ze gespoeld in gedestilleerd water en opnieuw gedroogd.

In deze preparaten kwamen slechts $2-3\ \mu$ lange staven voor, die gelijkmatig dicht waren en geen poolkorrels bevatten.

Van 2, 4, 7, 12 en 18 dagen oude cultures van *M. phlei* op Dubos' agar, werden de preparaten ook op laatstgenoemde wijze gemaakt.

In deze preparaten werden slechts kleine, ovale tot bijna ronde staafjes gevonden met vaag begrensde dichte poolkapjes.

Merkwaardig is de bevinding, dat 6 uur na enting lange staven gevonden werden, die een ovale verdikking in het midden bezaten. Waarschijnlijk groeiden de coccoïde staafjes zo snel uit, dat de vorm eerst later aan de nieuwe omstandigheden was aangepast, zodat de bacteriën dan over de gehele lengte even breed waren.

Bespreking

De ontwikkeling van de bacteriën in deze cultures geschiedde in grote trekken op dezelfde wijze. De meeste staven of staafjes bleken in de

eerste tijd na enting in lengte toe te nemen, waarna een periode van talrijke dwarsdelingen waargenomen werd.

De dwarsdeling geschiedde door een meestal scherpe ringvormige insnoering, die in verschillend vergevorderde stadia gevonden werd en die in wezen niet schijnt te verschillen met de deling bij andere bacteriesoorten. Volgens LEMBKE daarentegen, zou de deling uitsluitend geschieden door een geleidelijke versmalling van de bacterie op de plaats van deling.

Onvolledige delingen, waarbij de bacteriën nog door een cytoplasmabruggetje verbonden waren, werden enkele malen gezien. Zij waren vooral duidelijk, als door een scheur in het formvarvlies trek op de bacteriën werd uitgeoefend.

Reeds aan het einde van deze tweede periode nam de lengte van vele bacteriën iets af. Dit werd bij de humane stammen eerst 2 weken na enting duidelijk, zodat dan in het centrum van de strengen kleine staafjes gevonden werden. Aan de periferie bleven echter nog lange bacteriën voorkomen.

Later bleek een aantal bacteriën vlekkege differentiatie te vertonen en tot lysis over te gaan. Het beeld van de lysis was onregelmatig. Naast volkomen transparante, nagenoeg lege en ovale bacteriën, waarvan sommige nog dichte plekken aan de polen bezaten, kwamen amorphe vaag of flardig begrensde, homogene cytoplasmamassa's voor. Werden de preparaten geschaduwd, dan was te zien dat het cytoplasma in deze massa's in zeer kleine korrels uiteengevallen was en dat de transparante bacteriën bestonden uit lege omhulsels.

Toch is transparantie van de bacteriën niet altijd een uiting van lysis. Ook in jonge cultures van H37Rv kwamen gehele strengen van niet tot lysis overgegangene transparante bacteriën voor, die in vorm en aspect met de dichtere bacteriën overeenkwamen.

Behalve de bacteriën die zich snel kunnen vermeerderen, zullen in de oorspronkelijke cultures niet levensvatbare bacteriën voorkomen. Dit aantal werd vergroot door de pogingen die aangewend werden, om een disperse groei te verkrijgen op de voedingsbodem in de Petrischaal, waarbij de suspensie van de cultuur even (ten hoogste gedurende 5 minuten) in een parelflesje geschud werd. Deze bacteriën blijven geïsoleerd of in groepjes liggen. Een aantal blijft gedurende een tijd onveranderd liggen, andere gaan reeds dadelijk over tot degeneratie en lysis, waardoor homogene, vaag begrensde en vrijwel vormeloze cytoplasmamassa's en lege omhulsels te zien zijn.

Hoewel vrije korrels, „zoöglonale vormen” en „sporide ligging” van dichte plekken of korrels in de polen, niet zelden werden waargenomen, werden geen elementen gevonden, die de kloof tussen deze vormen en de bacteriën zouden kunnen overbruggen.

Het is mogelijk, dat deze tussenstadia wel voorkwamen, doch door het geringe oppervlak van de preparaten niet gevonden werden.

Om deze mogelijkheid uit te sluiten werd een globaal onderzoek verricht, waarbij filtraten van cultuursuspensies werden onderzocht in kweek- en dierproeven op het voorkomen van afwijkende, filtreerbare pathogene vormen, die zich tot bacteriën zouden kunnen ontwikkelen.

I. Een twee maanden oude cultuur van de stam H37Rv op de voedingsbodem van Loewenstein, werd overgeënt op 10 van deze voedingsbodems. Van deze media werd, evenals van 2 niet beënte voedingsbodems, na 24 uur bebroeden het oppervlak voorzichtig afgeschraapt. Het afstrijksel van beide series werd ieder in een parelflesje met 10 cm³ physiologische zoutoplossing gesuspenderd en deze suspensies werden gedurende een half uur in een schudmachine geschud. Daarna werden de beide suspensies gedurende 5 minuten door een Elfordmembraan met $APD=0,95\ \mu$ bij een druk van — 15 cm Hg gefiltreerd. Beide filtraten werden vervolgens gedurende een half uur op 30000 toeren gecentrifugeerd. De sedimenten werden, na verwijderen van de bovenstaande vloeistof, geresuspenderd in ongeveer 1 cm³ physiologische zoutoplossing. Van beide sedimenten werden preparaten voor electronenmicroscopisch onderzoek gemaakt; van het geresuspenderde sediment, verkregen van het filtraat der tuberkelbacteriën bevattende suspensie, werden preparaten ter kleuring volgens Ziehl-Neelsen gemaakt en werd geënt op voedingsbodems van Loewenstein; de rest diende voor onderhuidse besmetting van een cavia.

Resultaten. Tussen de twee reeksen van electronenmicroscopische preparaten werd geen verschil gezien. In de gekleurde preparaten werden geen zuurvaste staven gevonden. Op de voedingsbodems waren drie maanden na enting geen kolonies te vinden. De cavia reageerde drie maanden na besmetting niet op intracutane inspuiting van 1000 E tuberculine.¹

Vier maanden na besmetting werd het dier gedood. Bij de plaats van inspuiting (de lies) werden geen afwijkingen gevonden. In depreparaten van sneevlakken van de milt en de lieslymphkliertjes werden geen zuurvaste staven gevonden.

Op de voedingsbodems van Loewenstein, waarop van milt en lieslymphklieren geënt was, werden 3 maanden na enting geen kolonies gevonden.

II. Drie cultures van H37Rv — gedurende 4 maanden gekweekt op de voedingsbodem van Loewenstein — werden in 10 cm³ physiologische zoutoplossing gesuspenderd. De suspensie werd op dezelfde wijze behandeld als onder I werd beschreven.

¹ Alttuberculine (Rijksinstituut voor de Volkgezondheid); 1000 Eenheden=0.1 cm³ van een $\frac{1}{10}$ verdunning.

In de volgens Ziehl-Neelsen gekleurde preparaten, gemaakt van de uiteindelijk verkregen suspensie, werden geen zuurvaste staven gevonden. Op de voedingsbodems van Loewenstein werden drie maanden na enting geen kolonies gevonden. De met het filtraat subcutaan besmette cavia reageerde drie maanden na besmetting niet op intracutane toediening van 1000 E tuberculine. Twee maanden later werd het dier gedood. Bij sectie werden geen afwijkingen gevonden. In deppreparaten van milt en lieslymphkliertjes werden geen zuurvaste staven gezien. Op de voedingsbodems, die met suspensies van deze organen beënt waren, werden na drie maanden geen kolonies gezien; de met suspensies van deze organen onderhuids besmette cavia reageerde drie maanden na besmetting niet op 1000 E tuberculine. Bij sectie, die 3½ maanden na besmetting plaats had, werden geen afwijkingen gevonden. In deppreparaten van de sneevlakken van milt en lieslymphklieren werden geen zuurvaste staven gezien.

Preparaten voor electronenmicroscopisch onderzoek werden niet gemaakt.

III. Twee cultures van H37Rv, die gedurende 3 weken, en een cultuur van H37Rv die gedurende 3 maanden op de voedingsbodem van Loewenstein waren gekweekt, alsmede een cultuur van de stam SE, die gedurende 3 weken op Dubos' agar was gekweekt, werden gesuspendeerd in 10 cm³ physiologische zoutoplossing.

De suspensie werd op gelijke wijze behandeld en verwerkt als onder I werd aangegeven (met dit verschil dat de A.P.D. van de Elford membraan 0,45 µ bedroeg).

Op de voedingsbodem van Loewenstein werden drie maanden na enting van het filtraat geen kolonies gezien. De cavia waarbij het filtraat subcutaan werd ingespoten, reageerde drie maanden na besmetting niet op intracutane inspuiting van 1000 E tuberculine. Vier maanden na besmetting werd het dier gedood. Bij sectie werden geen afwijkingen gevonden.

In deppreparaten van de sneevlakken van milt en lieslymphkliertjes werden geen zuurvaste staven gezien. Met suspensies van deze organen beënte voedingsbodems van Loewenstein lieten drie maanden na enting geen groei zien.

Ook van dit filtraat werden geen preparaten voor electronenmicroscopisch onderzoek gemaakt.

De resultaten van dit globale onderzoek bevestigen de uitslag van het electronenmicroscopisch onderzoek der cultures.

Hoewel vele van de beschreven vormsels, zoals „sporiden” en dichte korrels, wat hun afmetingen betreft zeker filtreerbaar zouden zijn, konden uit de filtraten geen pathogene vormen geïsoleerd worden.

Uit het centrum van de reeds beschreven lytische plekken in de cultures van de stammen BE en R408 op Dubos' agar, waarin bij onderzoek met behulp van volgens Ziehl-Neelsen gekleurde preparaten lichtblauwe velden en ophopingen van donkerblauw gekleurde korrels voorkwamen, hebben wij trachten over te enten op voedingsbodems van Loewenstein en Dubos' agar. Drie maanden na enting werden op geen der voedingsbodems kolonies gevonden. Ook enting op bloed-agar had geen resultaat. (Evenmin lukte het, het lytisch principe over te enten.)

LAPORTE (1941, 1943) en LAPORTE en VENDRELY (1945) vonden dergelijke niet-zuurvaste vormsels bij autolyse van cultures van humane stammen. Deze korrels hadden slechts de eigenschappen van dode bacteriën (na inspuiting bij caviae werden de dieren allergisch t.o.v. tuberculine, maar hadden geen afwijkingen).

Een tweede contrôle op de resultaten, verkregen door electronen-microscopisch onderzoek, had plaats, door van enkele microcultures van H37Rv en M. phlei de groei met behulp van het phasecontrast-microscop na te gaan.

Op objectglazen werden 1 mm hoge messingringetjes met paraffine bevestigd. Vervolgens werden van een te voren beënte Dubos' agar stukjes uitgesneden en binnen de ringetjes gelegd. Op de ringetjes werden dekglasjes met paraffine zó bevestigd, dat de onderkanten van de dekglasjes in contact waren met de beënte oppervlakken van de stukjes voedingsbodem.

Steeds werden plekken opgezocht, waar de staven vrijwel geïsoleerd lagen. De cultures van H37Rv werden één tot twee maal per dag, de cultures van M. phlei op de dag van enting om de 3—4 uur, op de eerste dag na enting om de twee uur onderzocht. Na elke bebroedings-tijd werden de oorspronkelijke plekken weer opgezocht.

Twee cultures van H37Rv konden zo tot 6 resp. 8 dagen na enting vervolgd worden. Beide cultures waren uit een 10 dagen oude cultuur van H37Rv in Dubos' vloeibaar medium overgeënt. In enkele andere cultures was het niet steeds mogelijk de oorspronkelijke plaats terug te vinden en moest met incidentele waarnemingen, of met een twee- of drietal opeenvolgende waarnemingen volstaan worden.

Op de dag van enting en de eerste dag na enting lagen vrijwel alle staven geïsoleerd. In een cultuur bleken enkele staven zich de eerste dag na enting reeds gedeeld te hebben. Twee dagen na enting hadden in beide cultures de meeste staven zich gedeeld. Daarna werden delingen veelvuldiger gevonden. De deling had steeds overdwars plaats. In het begin der cultures bleken de staven zich na deling zo te bewegen, dat zij een steeds scherpere hoek met elkaar vormden. Slechts enkele bacteriën waren na deling voor een groter of kleiner gedeelte langs elkaar geschoven. Later, na de vierde dag, toen er reeds

kleine strengetjes van 6—8 bacteriën gevormd waren begon de tweede vorm van beweging te predomineren, hoewel nog enkele malen de hoekvorming gevonden werd.

In microcultures van *M. phlei*, verkregen door overenting van suspensies van cultures, gedurende 14—20 dagen gekweekt op de voedingsbodem van Loewenstein, werden 4 en 8 uur na enting voor het merendeel kleine coccoïde bacteriën gevonden. Van verscheidene staafjes bleek 8 uur na enting de lengte toegenomen te zijn. Sommige van deze hadden een breder centrum of bestonden uit een „korrel”, waaruit een fijn staafje leek te groeien. Van 8—15 uur na enting bleken vele delingen plaats gehad te hebben. De dag na enting had snelle vermeerdering plaats. Beide reeds genoemde „groeibewegingen” waren aan de periferie der ontstane microkolonies waar te nemen.

Andere staafjes bleken zich niet vermeerderd te hebben en lagen nog geïsoleerd of in onveranderde rangschikking.

Cultures van M. avium op Dubos' agar

In aansluiting aan de onderzoekingen van BRIEGER en FELL (1946) en BRIEGER en GLAUERT (1952) gingen BRIEGER c.s. (1954) de groeiwijze van *M. avium* met behulp van het electronenmicroscop na. Entten zij een cultuur van *M. avium*, die uit coccoïde staafjes bestond, over, dan zagen zij, dat de staafjes in lengte toenamen. Deze langere staven bleken ovale dichte plekken te bevatten, welke door BRIEGER c.s. „intracellular units” genoemd werden. De lange staven zouden zich gedurende een bepaalde tijd door dwarsdeling vermeerderen. vervolgens zou elke staaf uiteen vallen in verscheidene coccoïde vormen, die reeds als gepreformeerde elementen (de „intracellular units”) in de staven zouden voorkomen. Deze coccoïde vormen zouden weer aangroeien tot lange staven, waarna wederom een periode van vermeerdering door dwarsdeling zou volgen (in tegenstelling tot de opvatting, die BRIEGER en FELL in 1946 beschreven, dat de coccoïde vormen eerst na overenting weer in lengte zouden toenemen).

Wanneer de groei door vertakking zou plaats hebben, zouden zijtakken zich „vermoedelijk” kunnen afsplitsen. Na lysis en desintegratie van zulk mycelium zouden kleine ei- of peervormige staafjes met een lengte van ongeveer 0,4 μ vrijkomen. Deze staafjes zouden langer worden en aldus het uitgangspunt zijn voor een groeicyclus, zoals boven beschreven werd.

Hoewel de ontwikkeling van de cultures van *M. avium* in wezen niet verschilde van de groei der humane stammen, was het beeld gecompliceerder en moeilijker te interpreteren.

Cultures van *M. avium*, die gedurende resp. één, vijf en zes maanden op de voedingsbodem van Loewenstein gekweekt waren en bij electronenmicroscopisch onderzoek uit coccoïde staafjes met homogeen

cytoplasma en vaag begrensde iets dichtere poolkapjes bleken te bestaan, werden overgeënt op Dubos' agar.

Van de cultures op Dubos' agar werden preparaten gemaakt, door van de cultures op de formvarvliezen af te drukken. De preparaten werden gedroogd en daarna gedurende drie minuten in 1 % osmiumtetroxydedamp gefixeerd. Vervolgens werden de preparaten gespoeeld in gedestilleerd water en gedroogd.

Na één tot drie dagen werden voor het merendeel korte staafjes met transparant cytoplasma en iets dichtere, onscherp begrensde poolkapjes, of homogene staafjes gevonden. (Fig. 20.) Enkele staafjes bevatten kleine dichte korrels. Amorphe, lytisch veranderde bacteriemassa's kwamen voor. Deze werden in alle preparaten gedurende het gehele onderzoek van de cultures gevonden.

Reeds drie dagen na enting bleken enige bacteriën tot lange staven te zijn uitgegroeid.

Na vier en vijf dagen werden vele lange bacteriën gevonden. Bijna al deze staven bevatten vacuolen (of vaag begrensde transparante plekken) die vrijwel het gehele cytoplasma vulden. (Fig. 7.) In enkele staven bleken de transparante plekken samen te vloeien. In één cultuur kwamen ook vele bacteriën met homogeen en dicht cytoplasma voor, waarvan sommige één of twee ovale, vaag begrensde, transparante gebieden bevatten. Enkele bacteriën bestonden uit een dicht gedeelte dat abrupt of gedeeltelijk in een vrijwel lege bacteriewand overging. Ook kwamen nog de oorspronkelijke coccoïde vormen voor.

Van vijf tot acht dagen na enting werden dezelfde vormen gevonden. Enige lange, vacuolenbevattende bacteriën hadden knots- of kolfvormig verdikte dichte uiteinden, aan andere kwamen zijtakken voor. Behalve deze vormen werden dichte bacteriën gevonden, die op verscheidene plaatsen insnoeringen bezaten, zodat de staven aan fragmentatie onderhevig schenen te zijn. Enkele van deze bacteriën waren aan een of beide uiteinden knotsvormig verdikt.

Na zeven tot tien dagen werden vele kleinere staven met vacuolen en kleine coccoïde homogene staafjes met kleine poolkorrels gevonden. Sommige lange staven die nog voorkwamen, bevatten vele kleine, min of meer scherp omlijnde, transparante plekjes, zodat het cytoplasma er uit zag, alsof het een schuimstructuur had, of bevatten vlekkelig gedifferentieerd cytoplasma. Van vele lange bacteriën was slechts de bacteriewand overgebleven. Bij andere staven ging een dicht en homogeen deel in lege bacteriewand over. In sommige gefragmenteerde staven was de scheiding tussen de delen scherper geworden en waren de dichte fragmenten hoekiger van vorm. (Fig. 21.) Ook nu hadden enige van deze gefragmenteerde bacteriën knotsvormige uiteinden.

Na de tiende dag werden vele ovale bacteriën waargenomen, die

eerst nog kleine poolkorrels, later scherp of vaag begrensde poolkapjes bezaten. Behalve deze vormen werden tot het einde van het onderzoek (40 dagen na enting der cultures) vele gefragmenteerde staven gevonden, waarvan sommige dichte, andere vrijwel lege zijtakjes bezaten. Enige van deze staven liepen uit in knotsvormige verdikte einden. De meeste gefragmenteerde bacteriën werden minder dicht; vele bleken later geheel of gedeeltelijk vlekkelig gedifferentieerd te zijn, andere waren tenslotte nog slechts vaag begrensd en zagen er lytisch veranderd uit: vaag, rafelig of flardig begrensde staven, soms wisselend van breedte, soms met onregelmatig en rommelig gedifferentieerd cytoplasma. Enkele echter bestonden — ongeveer een maand na enting — uit ketens en staafjes met vaag begrensde poolkapjes: vormen die in structuur overeenkwamen met de geïsoleerd liggende coccoïde staafjes. Sommige vertakte vormen bezaten schuimig gestructureerd (Fig. 22) of vlekkelig gedifferentieerd cytoplasma, van andere was slechts de bacteriewand overgebleven.

Werden deze cultures op Dubos' agar overgeënt, dan werd dezelfde ontwikkeling waargenomen. Één dag na enting was het beeld nog polymorph en bestond uit lange, vaag begrensde, lytisch veranderde, gefragmenteerde staven, conglomeraten van kleine lytisch veranderde coccoïde vormen en staafjes met transparant cytoplasma en vaag begrensde poolkapjes.

Na twee dagen kwamen er reeds lange staven voor, die homogeen cytoplasma bezaten, of vele vacuolen of transparante plekken en dichte korrels bevatten, evenals homogene staafjes met kleine korrels. Van een enkele lange staaf was het cytoplasma geheel of gedeeltelijk in schuimstructuur veranderd. Grote amorphe of kleine ovale, lytisch veranderde massa's kwamen voor en werden gedurende het gehele tijdsverloop der cultuur gevonden.

Reeds drie à vier dagen na enting was het beeld meer eenvormig geworden en werden merendeels lange staven gevonden. De meesten bevatten vacuolen, of vaag begrensde transparante plekken; andere waren geheel of gedeeltelijk schuimig gestructureerd. (Fig. 23). Enkele vertakte vormen werden gevonden. Sommige van deze bestonden uit vrijwel homogeen cytoplasma, (Fig. 24) andere bevatten vele vacuolen. De meeste vertakte vormen waren evenwel voor een gedeelte homogeen, terwijl een ander gedeelte schuimig gestructureerd, vlekkelig gedifferentieerd, of vrijwel leeg was. (Fig. 25). Enkele staven met knotsvormige einden kwamen voor.

Na de zesde dag bleken de bacteriën in lengte af te nemen, totdat na ongeveer acht dagen de meeste staafjes ovaal en homogeen waren en kleine poolkorrels of vrij scherp begrensde poolkapjes bevatten. Behalve deze vormen kwamen lange gefragmenteerde staven voor, waarvan enkele vertakt bleken te zijn.

Veertien dagen na enting bleken de cultures te bestaan uit kleine coccoïde staafjes met scherp of vaag begrensde poolkapjes; lange al of niet vertakte draden, die geheel of gedeeltelijk bestonden uit schuimig gestructureerd of vlekkelig gedifferentieerd cytoplasma of gedeeltelijk uit stukken lege bacteriewand; lange gefragmenteerde staven, al of niet met knotsvormige einden, waarvan sommige lytisch veranderd waren en andere — althans ten dele — bestonden uit fragmenten, die in vorm en structuur overeenkwamen met de geïsoleerd liggende ovale staafjes; en conglomeraten van vaag begrensde coccoïde staafjes of amorphe en homogene massa's.

Deze ontwikkeling kon in volgens Ziehl-Neelsen gekleurde preparaten gevolgd worden. De oorspronkelijke cultures op de voedingsbodems van Loewenstein bestonden uit kleine zuurvaste staafjes.

Na overenting op Dubos' agar, nam het aantal lange en intensief zuurvast gekleurde staven gedurende de eerste zes dagen toe. Slechts enkele weinig intensief en gelijkmatig zuurvast gekleurde, lange al of niet vertakte draden werden gevonden. Behalve deze vormen kwamen ook kleine amorphe, niet-zuurvaste massa's voor, waarin enkele niet-zuurvaste doch intensief blauw gekleurde korrels lagen.

Na de zesde dag bleken de zuurvaste staven kleiner te worden. Sommige lange staven en draden schenen in een reeks van kleine zuurvaste staafjes gefragmenteerd te zijn. Lange, al of niet vertakte vormen bevatten eerst nog staafvormige zuurvaste gedeelten. Met het ouder worden der cultuur namen de niet-zuurvaste vormen in aantal toe en tenslotte bleken de cultures te bestaan uit kleine coccoïde zuurvaste en niet-zuurvaste staafjes, egaal en fletsblauw gekleurde al of niet vertakte draden, draden met knotsvormige uiteinden, draden die voor een gedeelte of in hun geheel opgebouwd waren uit niet-zuurvaste, intensiever gekleurde korrels en niet-zuurvaste detritus waarin intensief blauw gekleurde korrels voorkwamen.

Ter contrôle op het voorkomen van verontreinigende bacteriën, werden de cultures overgeënt op bloedagar. Na 48 uur werden op deze voedingsbodems geen kolonies gevonden.

Werden de cultures overgeënt op Dubos' agar, dan waren één dag na enting, behalve coccoïde staafjes, niet-zuurvaste korrelige of egaal gekleurde draden en detritus, reeds langere zuurvaste staven te zien.

Na twee en drie dagen werden al vele, egaal en intensief zuurvast gekleurde staven gevonden. Enkele intensief zuurvaste, maar ook niet-of weinig zuurvaste — al of niet vertakte — lange draden kwamen voor, evenals niet-zuurvaste, amorphe fletsblauw gekleurde, kleine velden.

Na vier dagen lagen de zuurvaste staven in grote velden gegroepeerd. Overigens was het beeld niet veranderd.

Na vijf dagen werden lange en korte zuurvaste staven gevonden. Ook kwamen gedeeltelijk niet-zuurvaste, voor een ander deel weinig zuurvaste — al of niet vertakte — draden voor. Andere draden schenen kleine zuurvaste staafjes of korrels te bevatten. Ook in enkele gelijkmatig lichtblauw gekleurde velden kwamen, behalve niet-zuurvaste korrels, zuurvaste staafjes en korrels voor.

Daarna veranderde het beeld geleidelijk. Zeven dagen na enting waren reeds vrijwel alle lange zuurvaste bacteriën verdwenen. Daarna werden steeds meer lange, in hun geheel niet-zuurvaste, al of niet vertakte, draden gevonden. Na achttien dagen bleken de cultures te bestaan uit kleine zuurvaste staafjes, lange fletsblauw gekleurde draden die al of niet intensief blauw gekleurde korrels bevatten, en niet-zuurvaste, korrelige of gelijkmatig gekleurde detritus.

Ter contrôle op de aanwezigheid van verontreinigende bacteriën werd van de cultures geënt op bloedagar; 48 uur na enting werden op deze voedingsbodem geen kolonies gevonden.

Bespreking

In de jonge cultures, waarin de lange staven predomineerden, werden vele figuren van dwarsdeling gevonden. Behalve de scherpe insnoering, zoals die bij humane stammen voorkwam, werden bij *M. avium* ook dwarsdelingen gevonden, waarbij de nieuw gevormde bacteriën geleidelijk ter plaatse van de deling van de oorspronkelijke staaf smaller werden. Ook bij *M. avium* werden de meeste staven door voortdurende dwarsdeling kleiner, zodat al na 6—9 dagen vooral kleine ovale staafjes werden waargenomen. De groei verschilde in wezen dus niet van de groei der andere types.

Daarentegen werden twee eigenaardigheden in de ontwikkeling der cultures gevonden. Aan sommige lange staven en draden in deze cultures werden zijtakken gevormd. In het stadium waarin de lange staven predomineerden, werden nog vertakte vormen gevonden, waarvan het cytoplasma dezelfde structuur bezat als van de andere bacteriën (vacuolen bevatte of vrijwel homogeen was, maar steeds dichte korrels bevatte). Later deden alle vertakte draden zich als gedegeneerde vormen voor. Zij waren dan in hun geheel of gedeeltelijk vlekkelig gedifferentieerd, schuimig gestructureerd of bevatten nog slechts enkele cytoplasmadeeltjes. Waren zij slechts gedeeltelijk gedegeneerd, dan was het andere deel nog homogeen, welk gedeelte dan abrupt of vloeiend in het gedegeneerde stuk overging. Deze laatste vormen kwamen vermoedelijk overeen met de gedeeltelijk nog zuurvaste bacteriën en de draden waarin enkele kernaequivalenten excentrisch lagen. Vermoedelijk gingen alle vertakte bacteriën tot degeneratie en lysis over.

Ook in een 8 dagen oude cultuur van BCG in Dubos' vloeibaar medium werden enkele vertakte bacteriën gevonden. Deze bleken, na

kleuring volgens Ziehl-Neelsen, gelijkmatig en weinig zuurvast gekleurd te zijn. Met het electronenmicroscop werden twee verstrengeld liggende, vertakte bacteriën gevonden. Deze bleken beide te bestaan uit een nagenoeg homogeen gedeelte en een deel met onregelmatige rangschikking van transparante en vrij dichte plekjes.

In hoeverre de vertakking tot de vermeerdering van het aantal bacteriën bijdroeg kon niet met zekerheid worden vastgesteld. Weliswaar werd een enkele maal een beeld gevonden waaruit zou kunnen blijken, dat de hoofdstam zich gedeeld had (de beide gedeelten hadden ieder een hoekig uiteinde, welke uiteinden op geringe afstand van elkaar lagen) of dat een zijtak zich had afgesplitst (een staaf die met een hoekige pool tegen de zijde van een andere bacterie lag). De deling zou echter ook plaats gehad kunnen hebben, vóórdat de bacteriën zijtakken gingen vormen en de „end to side” ligging zou toevalligerwijze ontstaan kunnen zijn, doordat in de kolonies druk op de bacteriën werd uitgeoefend.

Eénmaal werd een vertakte staaf gevonden, waarvan de vacuolen een zodanige verspreiding in de zijtak hadden, dat het proximale en distale stukje van de zijtak geen vacuolen bevatte en dat het leek alsof in deze zijtak een bacterie lag. Een dergelijke rangschikking waarbij in de polen van de staven geen vacuolen voorkomen, werd echter ook wel in niet vertakte bacteriën gevonden.

Nooit werden insnoeringen in de hoofdstammen of in de oorsprong van de zijtakken gevonden.

Gezien het feit, dat alle vertakte bacteriën die in oudere cultures gevonden werden, een gedegeneerd aspect hadden en tot lysis overgingen, moet vermeerdering door vertakking betwijfeld worden. Dat uit deze desintegrerende vertakte draden kleine staafjes zouden voortkomen, werd nooit waargenomen.

Een tweede eigenaardigheid van deze cultures was, dat zij na de periode waarin de lange staven in grote getale voorkwamen, verscheidene als het ware gefragmenteerde staven bevatten. De fragmenten, waaruit deze staven waren opgebouwd, hadden een hoekige vorm en waren zeer ongelijk van grootte. Ook deze gefragmenteerde staven konden tot vorming van zijtakken overgaan. In het begin waren de fragmenten homogeen en dicht, later hadden zij het aspect van bipolaire staafjes; meestal waren deze vreemd gevormd en wazig begrensd, zodat zij aan lysis onderhevig bleken te zijn, soms en vooral aan de einden van de gefragmenteerde staven hadden deze staafjes de structuur en de ovale vorm van de geïsoleerd liggende staafjes.

Of deze fragmentatie in wezen verschilt van de dwarsdeling, is niet te beoordelen. Het is niet uitgesloten dat zij een reeks van opeenvolgende, onvolledige delingen voorstelt. Niet zelden werden name-

lijk ook dergelijke, kleinere staven gevonden die twee van zulke fragmenten bevatten. Na overenting bleken alle, nog gevonden ge-fragmenteerde staven tot lysis te zijn overgegaan.

Ook in de cultures van *M. avium* werden niet zelden vrije dichte korrels en amorphe, gelijkmatig dichte cytoplasmamassa's gevonden.

VI

DE WIJZE VAN VERMEERDERING DER MYCOBACTERIËN IN WEEFSELS

Inleiding

Hoewel bij het onderzoek van cultures geen aanwijzingen gevonden werden voor het bestaan van een ontwikkelingscyclus, zou het mogelijk zijn dat een dergelijke wijze van reproductie in vivo voorkomt.

Zo vonden BRIEGER c.s. (1951), BRIEGER en GLAUERT (1953) met het electronenmicroscop in suspensies van organen, afkomstig van konijnen die besmet waren met bovine tuberkelbacteriën, uit welke suspensies de bacteriën door gefractionneerd centrifugeren verwijderd waren, kleine deeltjes van $0,2 \mu$ en grotere deeltjes van $0,6 \mu$. Deze deeltjes waren meestal rond, soms onregelmatig van vorm. Werd uit dergelijke suspensies geënt op kunstmatige voedingsbodems, dan konden geen tuberkelbacteriën gekweekt worden. Inspuiting van deze suspensies bij caviae veroorzaakte evenwel een snel verlopende tuberculose. Na filtratie van de suspensies zagen deze onderzoekers wel de deeltjes van $0,2 \mu$ met het electronenmicroscop, maar deze filtraten bleken niet pathogeen te zijn voor caviae.

In coupes van longen van 3 weken te voren intraveneus met tuberkelbacteriën besmette muizen vonden BRIEGER en GLAUERT (1954), behalve lengte- en dwarsdoorsneden van bacteriën, ook deeltjes van $0,6 \mu$.

Methode

Suspensies van met tuberkelbacteriën beënte chorioallantoismembranen en van organen van besmette muizen en één cavia werden, nadat uit deze suspensies de bacteriën door filtreren of gefractionneerd centrifugeren waren verwijderd, met het electronenmicroscop, door enting op voedingsbodems van Loewenstein en door subcutane inspuiting in de rechter lies bij caviae van 250—500 g op de aanwezigheid van niet-bacteriële, niet-kweekbare, virulente elementen onderzocht.

De voedingsbodems werden tot 3 maanden na enting regelmatig op kolonies onderzocht. Bij de caviae werd 2—3 maanden na inspuiting de reactie op 1000 E tuberculine nagegaan. Bij sectie die 3—5 maanden na besmetting plaats had, werd gezocht naar tuberculeuze afwijkingen. Werden in de deppreparaten, gemaakt van de sneevlakken van de milt en de gevonden lymphklieren, geen zuurvaste staven

gevonden, dan werden de milt en de lymfklieren in een mortier verwreven en gesuspenderd in physiologische zoutoplossing. Deze suspensie werd vervolgens gedurende een half uur gecentrifugeerd op 4000 toeren. Het sediment werd in ca 1 cm³ physiologische zoutoplossing geresuspenderd. Deze suspensie werd geënt op enkele voedingsbodems van Loewenstein.

4) Eén, 2, 3 en 6 dagen na enting van 0,1 cm³ van een 16 dagen oude cultuur van H37Rv in Dubos' vloeibaar medium op de chorioallantoismembraan van 6 dagen bebroede kippenembryo's, werden telkens 2 eieren geopend. De chorioallantoismembranen werden evenals een niet beënt vlies uit de eieren verwijderd en met glaspoeder in een mortier verwreven. Onder roeren werd aan het verwreven weefsel physiologische zoutoplossing toegevoegd. De aldus verkregen suspensies werden gedurende een half uur op 4000 toeren gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistoffen werden afgepipetteerd en gedurende een half uur op 8000 toeren afgedraaid. De sedimenten werden geresuspenderd in 10 cm³ physiologische zoutoplossing. Aan deze suspensies werd een adsorbens (100 mg Celite 535) toegevoegd, waarna deze mengsels gedurende 10 minuten bij 4° C verbleven. Hierna werden de mengsels gedurende 10 minuten op 4000 toeren gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistoffen werden afgepipetteerd. Daarna werd een van de suspensies — afkomstig van een besmette chorioallantoismembraan — gedurende 10 minuten door een Elfordmembraan met A.P.D. = 0,45 μ bij een druk van — 20 cm Hg gefiltreerd. Dit filtraat werd evenals de twee andere bovenstaande vloeistoffen gedurende een half uur op 30000 toeren afgedraaid. De sedimenten werden vervolgens geresuspenderd in physiologische zoutoplossing (ca 1 cm³). Van deze suspensie werden preparaten voor electronenmicroscopisch onderzoek en kleuring volgens Ziehl-Neelsen gemaakt. De rest van de suspensies, afkomstig van de besmette chorioallantoismembranen, werd geënt op voedingsbodems van Loewenstein. Op de derde dag na chorioallantoismembraanenting werd een gedeelte van deze suspensies bij caviae onderhuids ingespoten.

Resultaten. 1) Gefiltreerde suspensies.

In de volgens Ziehl-Neelsen gekleurde preparaten werden geen zuurvaste staven gevonden. In geen van de electronenmicroscopisch onderzochte preparaten werden vormen gevonden die niet in de contrôlepreparaten voorkwamen. Op geen van de voedingsbodems waren 3 maanden na enting kolonies te vinden.

De cavia reageerde 2 en 4 maanden na besmetting niet op intracutane inspuiting van 1000 E tuberculine. vijf maanden na besmetting werd het dier gedood. Afwijkingen werden niet gevonden. In depreparaten, gemaakt van de sneevlakken van de milt en de lieslymfkliertjes, werden geen zuurvaste staven gevonden. Op de met milt

en lymphkliertjes beënte voedingsbodems werden 3 maanden na enting geen kolonies gevonden.

2) Niet gefiltreerde suspensies.

In de gekleurde preparaten werden geen zuurvaste staven gevonden. In geen van de electronenmicroscopisch onderzochte preparaten werden vormen gezien die niet in de contrôlepreparaten voorkwamen. Op alle voedingsbodems van Loewenstein (met uitzondering van de op de tweede dag van het onderzoek beënte, die vier maanden later nog geen kolonies bevatten) werd 6 weken na enting groei gezien. De cavia reageerde 2 maanden na besmetting op intracutane inspuiting van 1000 en 100 E tuberculine. Vier maanden na besmetting werd het dier gedood. Bij sectie werden tuberculeuze veranderingen gevonden (vergroete regionale en hiluslymphklieren, kleine grijze haarden in de milt.) Deppreparaten van de lieslymphklieren en de milt bevatten talrijke zuurvaste staven.

B) Op de chorioallantoismembraan van gedurende 9 dagen bebroede kippenembryo's werd 0,1 cm³ geënt van een suspensie van een 1 maand oude cultuur van H37Rv op de voedingsbodem van Loewenstein.

Na 6 en 7 dagen bebroeden werden telkens 2 eieren geopend. De chorioallantoismembranen werden verwijderd en op de bovenbeschreven wijze behandeld (met dit verschil, dat nu gefiltreerd werd door een Elfordmembraan met A.P.D. = 0,95 μ ; electronenmicroscopisch te onderzoeken preparaten werden niet gemaakt).

Resultaten. 1) Gefiltreerde suspensies.

In de gekleurde preparaten werden geen zuurvaste staven gevonden. Drie maanden na enting waren op geen der voedingsbodems kolonies te zien. De caviae reageerden 3 maanden na besmetting niet op intracutane toediening van 1000 E tuberculine. Vier maanden na besmetting werden de dieren gedood. Tuberculeuze afwijkingen werden bij geen van beide gevonden. In deppreparaten van sneevlakken van de milt en de lieslymphklieren werden geen zuurvaste staven gevonden. Bij microscopisch onderzoek van lever, longen, milt en lieslymphkliertjes werden geen afwijkingen gevonden. Van suspensies van de verwreven milt en lieslymphklieren werd geënt op voedingsbodems van Loewenstein. De rest werd bij een cavia onderhuids ingespoten. Op de voedingsbodems waren 3 maanden na enting geen kolonies te zien. De beide caviae reageerden 2 maanden na besmetting niet op intracutane inspuiting van 1000 E tuberculine. Bij de sectie die 3 maanden na besmetting plaats had, werden geen afwijkingen gevonden. In de deppreparaten, gemaakt van de milt en de lieslymphklieren, werden geen zuurvaste staven gevonden.

2) Niet gefiltreerde suspensies.

In de gekleurde preparaten werden geen zuurvaste staven gevonden.

Beide caviae stierven 3 weken na inspuiting. Bij sectie werden (bij beide) vergrote lymphklieren op de plaats van inspuiting gevonden. Depreparaten van de sneevlakken van deze lymphklieren en de milt bevatten enkele zuurvaste staven.

Drie weken na enting waren op de voedingsbodems van Loewenstein, die met de suspensie van de na 6 dagen bebroeden verwijderde chorio-allantoismembraan beënt waren, enkele kolonies te zien. Op de andere voedingsbodems werden 3 maanden na enting geen kolonies gevonden.

C) Van een cavia, 6 weken na onderhuidse inspuiting van een 7 dagen oude cultuur van de stam SE in Dubos' vloeibaar medium gestorven aan gegeneraliseerde tuberculose, werden longen, lever en milt verweven in een mortier en vervolgens gesuspenseerd in physiologische zoutoplossing. De suspensie werd gefractionneerd gecentrifugeerd op 3500, 4500 en 8000 toeren, telkenmale gedurende een half uur. Na afzuigen van de bovenstaande vloeistof werd hieraan 100 mg Celite toegevoegd, waarna het mengsel in de koelcel gezet werd. Na tien minuten werd dit mengsel gedurende tien minuten op 4000 toeren gecentrifugeerd. Het bovenstaande werd afgepipetteerd en gedurende 10 minuten door een Elfordmembraan met A.P.D. = $0,95 \mu$ bij een druk van — 15 cm Hg gefiltreerd. Het filtraat werd daarna gedurende een half uur gecentrifugeerd op 30000 toeren. Het sediment werd in ongeveer 1 cm^3 physiologische zoutoplossing geresuspenseerd. Hiervan werden preparaten ter kleuring volgens Ziehl-Neelsen gemaakt en werd geënt op voedingsbodems van Loewenstein. De rest werd bij een cavia onderhuids ingespoten.

Resultaten. In de gekleurde preparaten werden geen zuurvaste staven gevonden. Op de voedingsbodems waren 3 maanden na enting geen kolonies te vinden. De cavia reageerde 3 maanden na besmetting niet op intracutane toediening van 1000 E tuberculine. Vier maanden na besmetting werd het dier gedood. Bij sectie werden geen afwijkingen gevonden. In de deppreparaten van de sneevlakken van de milt, de lieslymphklieren en een 3 mm groot tracheobronchiaal lymphkliertje werden geen zuurvaste staven gevonden. Op de voedingsbodems, waarop van de milt en de lymphklieren geënt was, werden 3 maanden na enting geen kolonies gevonden.

Uit de gefiltreerde suspensies werden geen filtreerbare vormen geïsoleerd. Met het electronenmicroscop werden geen filtreerbare of niet-filtreerbare vormen waargenomen. De tuberculose, die bij de caviae door inspuiting van niet gefiltreerde suspensies werd veroorzaakt, kon in vrijwel alle gevallen aan de aanwezigheid van tuberkelbacteriën in deze suspensies toegeschreven worden. Slechts éénmaal konden uit een suspensie, waarvan de inspuiting bij een cavia tuberculose tengevolge had, geen tuberkelbacteriën gekweekt worden.

Aangezien de electronenmicroscopisch onderzochte preparaten nog vrij veel verontreinigingen bevatten, werd overgegaan tot toepassing van de door GOGOLAK (1953) beschreven methode voor zuivering van weefselsuspensies die virus bevatten. Deze werkwijze berust op adsorptie van een gedeelte der eiwitten aan Celite 535 en precipitatie van de overige eiwitten met een specifiek precipiterend serum.¹

D) Swissmuizen werden intraveneus besmet met 0,15 cm³ van een 13 dagen oude cultuur van de stam R408 in Dubos' vloeibaar medium. Twee, 6, 11 en 15 dagen na besmetting werden telkenmale 5 van deze muizen evenals 5 niet besmette muizen afgemaakt. De longen werden uit de muizen verwijderd en verwreven in een mortier met glaspoeder. Het verwreven weefsel werd in physiologische zoutoplossing gesuspenderd. Deze suspensie werd gefractionneerd gecentrifugeerd op 4000, 8000 en 15000 toeren, telkens gedurende een half uur. Het sediment, bij het laatste centrifugeren neergeslagen, werd, na verwijderen van de bovenstaande vloeistof, in de centrifugebuis verwreven en geresuspenderd in 3 cm³ physiologische zoutoplossing (gewicht = 5 maal het oorspronkelijke gewicht aan muizenlongen). Aan deze suspensie werd 100 mg celite toegevoegd, waarna het mengsel gedurende 10 minuten bij 4° C werd gezet. Daarna werd het mengsel gedurende 10 minuten op 4000 toeren gecentrifugeerd. Het bovenstaande werd afgepipetteerd, waarna hieraan 1,5 cm³ van het precipiterend anti-muizenlongserum werd toegevoegd. Dit mengsel verbleef vervolgens overnacht bij 4° C. De volgende morgen werd de boven het precipitaat staande vloeistof afgepipetteerd. Het precipitaat werd in de buis verwreven en vervolgens in physiologische zoutoplossing gesuspenderd. Deze suspensie werd (met de bovenstaande vloeistof) op 4000 toeren gedurende een half uur gecentrifugeerd. De beide bovenstaande vloeistoffen werden afgezogen en bij elkaar gevoegd. Dit mengsel werd vervolgens gedurende een half uur op 15000 toeren gecentrifugeerd.

¹ Bij konijnen werd tweemaal, met een interval van 14 dagen, een mengsel van 1 cm³ muizenlongen- of chorioallantoismembraansuspensie en 1 cm³ „Bayol-Arlacel” intramusculair ingespoten. De weefselsuspensies werden bereid, door niet-besmette muizenlongen of chorioallantoismembranen te verwrijven en hieraan een tienvoudig gewicht aan physiologische zoutoplossing toe te voegen. Vervolgens werden de suspensies gedurende 10 minuten op 4000 toeren gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistoffen werden voor inspuiting gebruikt. Veertien dagen na de eerste en de tweede inspuiting werden de titers van de konijnensera ten opzichte van de weefselsuspensies bepaald. Deze suspensies waren op gelijke wijze bereid als de ingespoten suspensies.

Ten opzichte van chorioallantoismembraanweefsel was deze titer 1 : 4 na de eerste en 1 : 64 na de tweede inspuiting. Tegen muizenlongen bedroegen deze titers 1 : 8 resp. 1 : 256. Veertien dagen na de laatste inspuiting werden de konijnen verbloed.

Voor het gebruik werd het serum steeds gedurende een half uur bij 60° C geïnactiveerd.

cutane toediening van 0,1 cm³ van deze suspensie aan een tuberculeuze, op 1000 en 100 E tuberculine reagerende cavia had geen reactie tengevolge.

E) Op dezelfde wijze werden eivliezen, die met een 1 maand oude cultuur van H37Rv op de voedingsbodem van Loewenstein waren besmet, alsmede niet besmette chorioallantoïsmembranen (van gedurende 9 dagen bebroede kippenembryo's) behandeld.

Deze werden 1 en 3 dagen na besmetting verwijderd. Van de gezuiverde suspensies werden preparaten gemaakt voor kleuring volgens Ziehl-Neelsen en voor electronenmicroscopisch onderzoek.

Resultaten. In de gekleurde preparaten werden geen zuurvaste bacteriën gevonden. In geen van de electronenmicroscopisch onderzochte preparaten werden vormen gezien, die niet in de controlepreparaten voorkwamen.

F) Longen van Swissmuizen, intraveneus besmet met een 7 dagen oude cultuur van H37Rv in Dubos' vloeibaar medium, en van niet besmette muizen werden op soortgelijke wijze behandeld, met dit verschil, dat de suspensies op 10000 en 30000 toeren werden gecentrifugeerd (i.p.v. 8000 resp. 15000 toeren). Twee, 5 en 10 dagen na besmetting werden telkens 5 besmette en 5 niet besmette muizen afgemaakt. Het onderzoek geschiedde op gelijke wijze als onder D beschreven werd (slechts één cavia werd telkens onderhuids besmet).

Resultaten. In de gekleurde preparaten werden geen zuurvaste staven gevonden. In geen van de electronenmicroscopisch onderzochte preparaten werden deeltjes gezien, die niet in de controlepreparaten voorkwamen. Op geen van de voedingsbodems kwamen 3 maanden na enting kolonies voor. Intracutane inspuiting van de suspensies bij, op 1000 en 100 E tuberculine reagerende caviae had geen reactie tengevolge. De cavia, besmet met de eerste suspensie (van de longen die 2 dagen na inspuiting bij de muizen verwijderd waren) stierf 3 weken na de besmetting. Bij sectie werden geen afwijkingen gevonden. In de deppreparaten van sneevlakken van milt en lieslymfklieren werden geen zuurvaste staven gevonden. Op de met milt en lieslymfklieren beënte voedingsbodems kwamen 3 maanden na enting geen kolonies voor.

Ook bij de cavia, die met de tweede suspensie (na 5 dagen) besmet was, werden 3 maanden na besmetting geen afwijkingen waargenomen. In de deppreparaten van de sneevlakken van de milt en de lieslymfklieren werden geen zuurvaste staven gezien. Op de met milt en lieslymfklieren beënte voedingsbodems waren 3 maanden na enting geen kolonies te vinden. Het dier had 2 maanden na besmetting niet gereageerd op intracutane toediening van 1000 E tuberculine.

De derde cavia, bij welke een suspensie van 10 dagen na besmetting

verwijderde longen was ingespoten, reageerde 2 maanden na besmetting op de intracutane toediening van 1000 E tuberculine met de vorming van een 20 mm grote platte papel. Drie maanden na besmetting werd het dier afgemaakt. Bij sectie werden tuberculeuze afwijkingen gevonden; deppreparaten van de verkaasde lieslymphklieren en van de milt bevatten talrijke zuurvaste staven.

In de meeste experimenten werden geen verschillen tussen kweek- en dierproef gevonden. Tweemaal had inspuiting van een suspensie, waaruit geen tuberkelbacteriën gekweekt konden worden, bij een cavia tuberculose tengevolge. De tuberculose van de caviae zou dus in deze laatste gevallen het gevolg kunnen zijn van besmetting met niet-kweekbare, niet-bacteriële, virulente elementen. In de andere gevallen kon de tuberculose van het proefdier toegeschreven worden aan de aanwezigheid van tuberkelbacteriën in de suspensie, te meer omdat met het electronenmicroscop geen prebacteriële vormen gevonden werden.

Deze laatste, negatieve bevinding zou het gevolg kunnen zijn van het feit, dat 1) deze vormen in de onderzochte suspensies niet voorkwamen, of van de mogelijkheid, dat 2) een gedeelte van deze vormen door het tussentijdse centrifugeren op hoog toerental (6000, 8000 of 10000 toeren) reeds neergeslagen wordt en de rest niet gevonden wordt, doordat slechts een gering volumen van de suspensies met het electronenmicroscop onderzocht kan worden, zelfs wanneer een groot aantal preparaten gemaakt wordt.

Om deze laatste mogelijkheid uit te sluiten werden twee cultures, een 6 weken oude cultuur van H37Rv op de voedingsbodem van Loewenstein en een even oude cultuur van *M. avium* op Dubos' agar in suspensie gebracht; 0,1 cm³ van deze suspensies werd geënt op de chorioallantoismembraan van 9 dagen bebroede kippenembryo's. Eén, 3 en 5 dagen na enting werden telkens twee met de cultuur van H37Rv, twee met de cultuur van *M. avium* beënte en twee niet besmette chorioallantoismembranen verwreven en behandeld op soortgelijke wijze als onder D is aangegeven. Het centrifugeren op 8000 toeren werd echter nagelaten; telkens wanneer op 4000 toeren werd gecentrifugeerd, werd dit slechts gedurende 10 minuten gedaan.

Van de gezuiverde suspensies werden preparaten voor kleuring volgens Ziehl-Neelsen en voor electronenmicroscopisch onderzoek gemaakt.

Resultaten. In de gekleurde preparaten werden geen bacteriën gevonden. In geen van de electronenmicroscopisch onderzochte preparaten werden elementen gezien, die niet in de contrôlepreparaten voorkwamen.

Bespreking. In tegenstelling tot filtratie bleek gefractionneerd centrifugeren een niet betrouwbare methode voor verwijdering van de tuberkelbacteriën te zijn. Slechts viermaal had inspuiting van een door gefractionneerd centrifugeren gezuiverde suspensie geen tuberculose van de cavia tengevolge. In de meeste proeven veroorzaakte zij echter tuberculeuze afwijkingen, waarbij slechts tweemaal uit zulke suspensie geen tuberkelbacteriën gekweekt konden worden. Dit verschil in resultaten van kweek- en dierproef behoeft niet te berusten op besmetting met niet-kweekbare elementen, maar kan ook veroorzaakt worden door het verschil in gevoeligheid, dat er tussen de twee methodes van onderzoek bestaat. Zulk verschil in resultaten heeft dan ook geen bewijskracht en zou slechts als argument voor het bestaan van prebacteriële, niet-kweekbare vormen gebruikt kunnen worden, als dit verschil bij herhaling gevonden wordt. Slechts negatieve resultaten, bereikt zowel in de kweek- als in de dierproef, kunnen als argument beschouwd worden (voor de afwezigheid van prebacteriële elementen). Gezien de resultaten van het electronenmicroscopisch onderzoek en de volstrekt negatieve resultaten in enkele experimenten, is een gegronde twijfel aan het voorkomen van pathogene, niet-kweekbare vormen van de tuberkelbacterie gewettigd.

VII

SLOTBESCHOUWING

De resultaten die bij het onderzoek van de groei der cultures verkregen werden, bevestigen vele reeds eerder beschreven waarnemingen. Deze waarnemingen moeten echter anders geïnterpreteerd worden. De bevinding dat kleinere deeltjes dan bacteriën in een cultuur voorkomen, is, wanneer men de mogelijkheid van artefacten uitsluit, steeds voor tweeërlei uitleg vatbaar. Deze deeltjes kunnen een uiting zijn van een ontwikkelingscyclus, zij kunnen ook het product zijn van desintegratie en lysis.

De ontwikkeling van de deeltjes tot bacteriën kon met behulp van het electronenmicroscop niet aangetoond worden, hoewel deze deeltjes niet zelden gevonden werden. De vergelijking met een andere ontwikkelingscyclus waarin andere elementen dan bacteriën voorkomen, namelijk de sporevorming, is hier wel op haar plaats. Bij verscheidene bacteriesoorten lukte het, deze sporevorming en de ontwikkeling van de sporen tot bacteriën tot in details met het electronenmicroscop te bestuderen. In principe zou het dus mogelijk zijn een dergelijke ontwikkeling te volgen, terwijl de mogelijkheid dat de op kunstmatige voedingsbodems gevormde deeltjes zich slechts in vivo en niet op kunstmatige media zouden kunnen ontwikkelen tot bacteriën, wel zeer onwaarschijnlijk is.

In suspensies van geïnfecteerde weefsels werden geen filtreerbare, niet-kweekbare (maar pathogene) elementen gevonden, terwijl de afwezigheid van grotere niet-kweekbare pathogene deeltjes in weefsel in een aantal experimenten kon worden aangetoond.

In de meeste dierproeven kon het ontstaan van tuberculeuze afwijkingen aan de aanwezigheid van tuberkelbacteriën in de suspensies toegeschreven worden. Slechts uit twee suspensies, waarvan inspuiting bij caviae tuberculose veroorzaakte, werden geen tuberkelbacteriën gekweekt. Op het verschil in gevoeligheid tussen kweekproef (op voedingsbodems van Loewenstein) en dierproef (inspuiting bij caviae) werd al gewezen. De meest waarschijnlijke verklaring voor de aanwezigheid van tuberkelbacteriën in de door gefractionneerd centrifugeren gezuiverde suspensies lijkt ons het opwervelen van bacteriën uit het sediment in de bovenstaande vloeistof, wanneer deze afgepipetteerd wordt. Is dit aantal opgewervelde bacteriën kleiner dan de hoeveelheid, die vereist is om groei op de voedingsbodems te veroorzaken,

dan zal alleen door inspuiting bij de cavia de aanwezigheid van tuberkelbacteriën in de suspensie aangetoond worden.

In geen van de suspensies konden met het electronenmicroscop deze grotere, niet-kweekbare deeltjes gevonden worden.

Dat de tuberkelbacterie zich door middel van een ontwikkelingscyclus zou kunnen vermeerderen, is dan ook zeer onwaarschijnlijk.

Dat uit zuurvaste korrels fijne staafjes groeien, is wel mogelijk en kon met behulp van het electronenmicroscop bevestigd worden. Deze zuurvaste korrels zijn dan echter geen „kleinere deeltjes”, doch coccoïde bacteriën. Bij *M. phlei* werden zes uur na enting vormen waargenomen, die op een uitgroeien van fijne staafjes wezen. Niet-zuurvaste korrels, die bijv. in, aan lysis onderhevige, cultures van de humane stammen voorkwamen groeiden bij overenting niet.

In vorm afwijkende bacteriën of geïsoleerd liggende kleinere elementen (zoals bijv. korrels) kunnen producten zijn van artefactie of van degeneratie of lysis. Hoewel *Mycobacteriën* minder gevoelig zijn voor de beschadigende invloed van verscheidene werkwijzen, zoals het drogen van suspensies in physiologische zoutoplossing of spoelen in gedestilleerd water (waarvoor andere bacteriesoorten zeer gevoelig zijn) moet de invloed van schudden niet onderschat worden. Zo werden in het begin van dooierzak-cultures bizar gevormde staven gevonden, waarvan slechts door het vaststellen van hun afwezigheid in niet beënt dooiermateriaal kwam vast te staan, dat deze staven tuberkelbacteriën waren.

Aangezien ook voor het enten op de vaste voedingsbodems (bereid in Petrischalen) de voor overenting gebruikte cultuursuspensie even geschud moest worden, — wat overigens ten hoogste gedurende 5 minuten gebeurde — om een zo goed mogelijke verspreiding van het inoculum te verkrijgen, is de mogelijkheid niet uitgesloten, dat korrels niet alleen door lysis, maar ook door schudden vrij kwamen te liggen. Ook is het mogelijk dat door dit schudden enkele bacteriewanden scheurden en het cytoplasma daardoor als een amorphe massa vrij kwam te liggen. Slechts een enkele maal werd een beeld gevonden waaruit zou kunnen blijken, dat het cytoplasma uit de overigens lege bacteriewand „ontsnapte”. Deze mogelijkheid geldt vooral voor dergelijke in de eerste dagen der cultuur gevonden korrels en bacteriemassa's.

De meeste, vooral de later in de cultuur gevonden, vrije korrels en amorphe cytoplasmamassa's zijn echter het product van lysis. De resultaten van de lysis zijn verschillend: behalve vrijwel amorphe cytoplasmamassa's die al of niet korrels of dichte plekken bevatten, werden, vooral in de oude cultures, lege bacteriewanden gevonden, die soms nog dichte en volumineuze gebiedjes aan de polen bevatten. In een cultuur van *H37Rv* kon deze overgang tot lysis gevolgd worden. Het cytoplasma differentieerde eerst in wazig begrensde,

dichtere en minder dichte plekken. Ook deze dichtere plekken verdwenen later, zodat geheel transparante bacteriën overbleven, die zich na schaduwen als lege bacteriewanden voordeden. Bij andere bacteriën werden de begrenzingen onscherp zodat vaag begrensde cytoplasmamassa's met, aan één of beide polen liggende, dichtere plekken overbleven.

Hoewel bij *M. avium* de degeneratie en lysis niet geheel gevolgd kon worden, is het waarschijnlijk, dat sommige vacuolen in bepaalde bacteriën zich met vloeibare inhoud vulden en dan veranderden in vager begrensde, geheel transparante plekken. Deze holten bleken in sommige bacteriën te conflueren, bij andere vielen zij vermoedelijk uiteen in verscheidene kleine holten, zodat het cytoplasma een schuimig aspect verkreeg. Bij een gedeelte der bacteriën differentieerde het cytoplasma in vaag begrensde, dichtere en minder dichte gedeelten. Tenslotte werden ook in de cultures van *M. avium* verscheidene, geheel of gedeeltelijke lege bacteriewanden gevonden.

Waarom bij sommige gelyseerde bacteriën de wand achterblijft en bij andere verdwijnt, waarom dus lege bacteriewanden én vaag begrensde in korrels uiteengevallen cytoplasmamassa's gevonden worden, kunnen wij niet verklaren.

In oude cultures van H37Rv kwamen beide vormen naast elkaar voor; het is echter weinig waarschijnlijk dat de amorphe massa's uit de nog intacte bacteriewanden afkomstig waren, gezien het feit dat enkele van deze massa's volumineuze „korrels” aan de polen bevatten. In cultures van *M. avium* kwamen vooral lege bacteriewanden voor, in lytische plekken in cultures van de stammen BE en R408 werden uitsluitend de cytoplasmamassa's gevonden.

De mogelijkheden van het electronenmicroscop bij het onderzoek der structuur van tuberkelbacteriën zijn nog zó beperkt, dat vele conclusies beperkt blijven tot vermoedens.

Als middelen om het gebrek aan contrast — de oorzaak dat (waarschijnlijk) wel aanwezige structuurelementen niet zichtbaar of vaag begrensd blijken te zijn — op te heffen, werden al genoemd het schaduwen van preparaten en het snijden van coupes. Voor zover het gebrek aan contrast veroorzaakt wordt door de gelijke dichtheid van de (niet aan de oppervlakte liggende) structuurelementen, voldoen deze middelen niet. Ook door kleuring met organische kleurstoffen wordt het contrast niet beter. Contrastverhoging is slechts te verwachten van behandeling met anorganische stoffen, waarvan vooral verbindingen van zware metalen (zoals osmiumtetroxyde) vaak gebruikt worden. Deze verbindingen zijn waarschijnlijk echter niet selectief voor bepaalde stoffen (daarenboven werden de tuberkelbacteriën, als zij langer dan drie minuten gefixeerd werden, slechts gelijkmatig dichter).

Misschien zal het in de toekomst mogelijk zijn, zware metalen zó

te binden aan specifieke organische kleurstoffen, dat beider eigenschappen behouden blijven. Met deze verbindingen zouden dan selectieve electronenmicroscopische „kleuringen” mogelijk zijn, wat vooral voor het onderzoek van de kernstructuur der bacteriën van groot belang zou zijn. Hoewel in sommige bacteriën ovale of ronde plekken voorkwamen, die minder dicht dan het overige cytoplasma of zelfs bijna transparant waren en in ligging met kernaequivalenten overeenkwamen, was het niet mogelijk op basis van de dichtheid een vergelijking te maken, want deze gebieden kwamen niet in alle bacteriën voor.

In het bijzonder dwong de — toevallige, eenmalige, niet bij de bespreking van het onderzoek vermelde — vondst van enkele verontreinigende bacteriën in een cultuur van de stam SE, die, op enkele dichte plekken na, leeg waren en waarvan de kernaequivalenten in de overeenkomstige lichtmicroscopische preparaten, gekleurd volgens Piekarski-Robinow, dezelfde vorm en ligging hadden als deze dichte plekken, ons tot voorzichtigheid.

Met een „kernkleuring” door de reeds genoemde verbindingen, zou het mogelijk zijn voor deze kwestie een oplossing te vinden. Daarenboven zou men dan waarschijnlijk de fijnere structuur van de als kernen gekleurde gebieden kunnen onderzoeken, wat tot nu toe onmogelijk is, zodat men zich tot de nietszeggende termen „nucleoiden” of „kernaequivalenten” heeft moeten bepalen.

Welke mogelijkheden het electronenmicroscopisch onderzoek van tuberkelbacteriën verder biedt, is nog moeilijk te beoordelen. Het is waarschijnlijk, dat met het electronenmicroscop beter dan in gekleurde preparaten te beoordelen is, welke vormen nog levensvatbaar zijn. Zo hebben GRASSET en BONIFAS (1951) het aantal levensvatbare bacteriën van B.C.G. in een op de klassieke wijze bereid vaccin (door mechanisch dispergeren van vliezen, die aan de oppervlakte van Sauton medium groeiden) vergeleken met dit aantal van cultures in Dubos' vloeibaar medium (die als vaccin gebruikt zouden kunnen worden), waarbij bleek dat in het vaccin vele lege en gescheurde bacteriewanden voorkwamen en dat in dit opzicht de cultures in Dubos' vloeibaar medium superieur waren.

Voorts lijkt het mogelijk, met behulp van het electronenmicroscop de werking van antibiotica en chemotherapeutica op een andere wijze te benaderen. Daarvoor is echter vereist, dat de methode waarop de preparaten vervaardigd worden geen artefacten met zich meebrengt en dat de degeneratie en lysis, die steeds wel in cultures optreden, te onderscheiden zijn van het resultaat der werking van de te onderzoeken antibiotica.

VIII

SAMENVATTING

De structuur en de wijze van vermeerdering van *M. avium*, *M. phlei* en vier humane stammen van *M. tuberculosis* werden met behulp van het electronenmicroscop nagegaan.

De stam H37Rv werd op verschillende media gekweekt: de dooierzak van bebroede kippenembryo's, de voedingsbodem van Loewenstein, Dubos' agar en Friedmann's medium; de andere humane stammen (SE, BE en R408), *M. avium* en *M. phlei* werden op Dubos' agar gekweekt.

Van de meeste cultures op vaste voedingsbodems werden de preparaten gemaakt, door objectdragers met het formvarvlies op de cultuur te drukken; van enkele cultures op vaste voedingsbodems en alle cultures in vloeibare media werden de preparaten vervaardigd door druppels van de cultuursuspensies of van de vloeibare media op de objectdragers te laten drogen. Alle preparaten werden gefixeerd in osmiumtetroxydedamp.

In vrijwel alle bacteriën van de onderzochte stammen en types, met uitzondering van H37Rv, kwamen meestal bij de polen, soms dichter bij het centrum liggende, dichte, scherp begrensde korrels van 50—400 m μ doorsnede voor (meestal ongeveer 200 m μ groot), die bij intensieve blootstelling aan electronen beschadigd werden. Doordat zij in het electronenmicroscopisch beeld overeenkwamen in dichtheid, vorm en gevoeligheid t.o.v. electronen met soortgelijke korrels bij andere bacteriesoorten, oplosbaar waren in zuren en verdwenen bij het ouder worden der cultures, moeten zij als volutinekorrels beschouwd worden. In cultures van H37Rv bevatten sommige bacteriën dergelijke korrels; in de meeste bacteriën van H37Rv kwamen vaag begrensde, ronde of ovale plekjes in de polen voor, die dichter waren dan het overige cytoplasma. Met het ouder worden der cultures werden deze plekjes in sommige bacteriën dichter, zodat zij het aspect van korrels kregen.

In oudere cultures bevatten de meeste kleine en ovale bacteriën aan de polen vaag begrensde plekjes, die iets dichter waren dan het overige cytoplasma.

In jonge cultures van *M. avium* (minder in dergelijke cultures van de humane stammen en *M. phlei*) werden in bijna alle bacteriën op vacuolen gelijkende plekken gevonden, die omgeven waren door fijne membranen en door het gehele of nagenoeg gehele cytoplasma ver-

spread lagen. In andere jonge bacteriën van *M. avium* kwamen ovale tot ronde, vager begrensde, transparante plekjes voor, die als de vacuolen, maar soms onregelmatiger in het cytoplasma verspreid lagen. De meeste vacuolen verdwenen, andere gingen in transparante plekken over, die gezien het feit dat het bacterie-oppervlak na schaduwen ter plaatse ingevallen bleek te zijn, waarschijnlijk holten zijn gevuld met vloeibare, vluchtige inhoud, die bij het drogen verdampt. Vermoedelijk vielen sommige van deze holten uiteen in kleinere transparante plekjes, zodat een schuimige structuur ontstond. Bij andere bacteriën confluëerden zij. Waarschijnlijk zijn deze transparante gebieden een uiting van beginnende degeneratie.

In sommige bacteriën van alle onderzochte stammen en types echter, werden twee of meer ovale of ronde plekken gevonden, die minder dicht dan het cytoplasma of transparant waren en in hun ligging overeenkomst vertoonden met kernaequivalenten. Waarschijnlijk doen de kernaequivalenten zich als zodanig voor.

Van de meeste bacteriën, vooral in de jonge cultures, was het overige cytoplasma vrijwel homogeen; ook wanneer coupes van de bacteriën gesneden werden, was het cytoplasma homogeen. Met het ouder worden der cultures werd het cytoplasma gedifferentieerd in wazig begrensde, dichtere en minder dichte plekjes. Deze differentiatie is een uiting van degeneratie en lysis.

Nooit werden aanwijzingen voor het bestaan van een waskapsel gevonden.

De kernstructuur van de *Mycobacteriën* werd met het lichtmicroscop onderzocht na kleuring volgens Piekarski-Robinow, Feulgen of Delamater-van Duijn. De kernequivalenten werden steeds gezien als ronde tot langgerekte (staafjesvormige) korrels. In zeer jonge cultures bleken de kleine staafjes één ovale korrel te bevatten, die bijna de gehele bacterie vulde. De langere staven bevatten evenals de bacteriën in de periode van optimale vermenigvuldiging een (of twee) staafjesvormige of verscheidene (twee tot zes) ronde korrels. In oude cultures bevatten de kleine staafjes een ovale korrel, de lange staven verscheidene ronde korrels. Delingsfiguren van de kernaequivalenten werden zelden gevonden, waarschijnlijk door hun geringe afmetingen. Vertakte bacteriën van *M. avium* bevatten soms vele (tot zestien) korrels; in de meeste vertakte bacteriën werden echter slechts enkele, excen-trisch gelegen, korrels gevonden.

Proeven die ten doel hadden, de kernaequivalenten met het electronenmicroscop zichtbaar te maken door reacties met alkalische zilveroxyde-oplossingen op de vrijgemaakte aldehydegroepen in D.N.Z. voldeden niet aan de verwachtingen.

Bij onderzoek van de groei der cultures werden geen aanwijzingen gevonden voor het bestaan van een ontwikkelingscyclus van de tuberkelbacterie. In de jonge cultures op vaste voedingsbodems werden vele

figuren van dwarsdeling gevonden. De deling bleek steeds te worden ingeleid door een scherpe ringvormige insnoering. In vele preparaten werden vrije korrels, amorphe vrijwel homogene massa's, waarin korrels konden liggen en sporide ligging van korrels of dichte gebiedjes gevonden. Nooit werden aanwijzingen gevonden, die er op zouden kunnen wijzen dat deze vormen zich tot bacteriën kunnen ontwikkelen.

De groei van aviaire bacteriën kan plaats vinden door vorming van zijtakken. De mogelijkheid dat deze groei tot vermeerdering bijdroeg, moet betwijfeld worden. Alle vertakte bacteriën in oudere cultures hadden een gedegenereerd cytoplasma of bestonden geheel of gedeeltelijk uit een lege bacteriewand en waren niet zuurvast. Enkele lange aviaire bacteriën schenen in talrijke kleine, hoekige staafjes uiteen te vallen. Sommige van deze gefragmenteerde staven waren in oudere cultures in hun geheel gelyseerd, in andere van deze bacteriën leken enkele fragmenten op geïsoleerd liggende staafjes. Gefragmenteerde bacteriën werden steeds tot het einde van de observatietijd gevonden en waren dan niet zuurvast. Na overenting bleken alle gevonden gefragmenteerde bacteriën aan lysis onderhevig te zijn. De mogelijkheid dat deze fragmentatie een reeks van opeenvolgende onvolledige delingen voorstelt, is niet uitgesloten.

In suspensies van weefsels, waaruit de tuberkelbacteriën door filtreren of gefractionneerd centrifugeren waren verwijderd, werden met het electronenmicroscop geen filtreerbare of grotere deeltjes uit een ontwikkelingscyclus van de tuberkelbacterie gevonden.

Uit filtraten van suspensies van cultures of geïnfecteerde weefsels (chorioallantoïsmembranen) konden door kweken op kunstmatige voedingsbodems, noch door besmetting van caviae pathogene elementen geïsoleerd worden.

Gefractionneerd centrifugeren bleek als methode om tuberkelbacteriën uit weefselsuspensies te verwijderen, onbetrouwbaar. Uit zo behandelde weefselsuspensies die na inspuiting bij caviae tuberculose veroorzaakten, konden meestal tuberkelbacteriën op kunstmatige voedingsbodems gekweekt worden. Slechts in twee experimenten konden uit deze suspensies geen tuberkelbacteriën gekweekt worden, terwijl inspuiting bij caviae wel tuberculose tengevolge had.

In vier proeven konden uit suspensies geen tuberkelbacteriën gekweekt worden en konden door inspuiting bij caviae geen pathogene vormen geïsoleerd worden.

Het bestaan van filtreerbare of niet filtreerbare pathogene deeltjes, die zich tot tuberkelbacteriën ontwikkelen is niet waarschijnlijk.

IX

SUMMARY

The structure and the multiplication of *M. avium*, *M. phlei* and four strains of tubercle bacilli of the human type (H37Rv, SE, BE, and R408) were studied by means of the electron microscope.

Strain H37Rv was grown on various media (Loewenstein's medium and Dubos' solid medium, in Friedmann's medium and in the yolk sac of embryonated chicken eggs). The strains SE, BE and R408, *M. avium* and *M. phlei* were grown on Dubos' solid medium. Impression prints were made from most cultures on solid media; from some cultures on solid media and from all cultures in liquid media preparations were made by drying drops of the suspensions or liquid media on the grids. Osmic acid fumes were used for fixation. In almost all bacilli of the studied types and strains, with exception of H37Rv, sharply defined granules were found with a diameter of 50—400 m μ (most of them were about 200 m μ) lying near the poles, but sometimes in the centre of the bacillus. These granules could be damaged by electron bombardment. The following properties: resemblance with such granules in bacteria other than *Mycobacteria*, solubility in acids and their disappearance in bacteria from older cultures, make it most likely that they belong to the group of the volutin granules. Only some bacteria from cultures of H37Rv contained such granules; in most bacilli of this strain round or oval, non-circumscribed areas were found near the poles; these areas were denser than the rest of the cytoplasm. In bacilli from older cultures these areas became denser, they even got sometimes the appearance of granules. The small and oval bacilli from old cultures of all strains and types contained non-circumscribed areas near the poles, which were somewhat denser than the rest of the cytoplasm. In most bacilli from young cultures of *M. avium* (and less frequently in bacilli from young cultures of the human strains and *M. phlei*) many areas were found, resembling vacuoles, surrounded by delicate membranes and occupying the whole or nearly the whole of the bacillus. In other bacilli of *M. avium* round or oval, nearly transparent areas were found, lying like vacuoles but somewhat more irregularly distributed in the cytoplasm. In bacilli from aging cultures of *M. avium* most of the vacuoles disappeared, other vacuoles changed into transparent areas. These areas contained probably a fluid content, which evaporated during drying because after shadowing, the bacterial surface seemed flattened at the places

of the transparent areas. Possibly some of these transparent areas disintegrated into smaller areas, which gave a foamy aspect to the cytoplasm. In other bacilli however these areas seemed to conflate. These transparent areas are apparently evidence of beginning degeneration. However, in some bacteria of all studied strains and types one or more round or oval areas were found, which were almost transparent or less dense than the rest of the cytoplasm. According to their localisation they could be nuclear aequivalents. The rest of the cytoplasm, especially in bacilli from young cultures appeared to be homogeneous, even in sections of the bacilli. In some bacilli from aging cultures the cytoplasm differentiated into non circumscribed, more and less dense areas. This differentiation is a sign of degeneration or lysis.

There was no evidence whatsoever for the existence of a waxy capsule around the bacilli.

The nuclear apparatus was studied with the light microscope after staining. The staining methods of Piekarski-Robinow, Feulgen and Delamater-van Duijn were used. Nuclear aequivalents were seen as round to elongated granules. The little bacilli from very young cultures contained one oval granule which filled nearly the whole bacillus. In longer rods as well as in bacilli which were in the phase of optimal multiplication one or two elongated or several (two till six) round granules were found. Little bacilli from old cultures contained one oval granule, the long rods several round granules. Fission of these granules seldom was seen, possibly as a result of their small diameter. Some branching filaments of *M. avium* were loaded with granules (up to sixteen). In most branching bacteria however only few eccentrically lying granules were found. All attempts to show the nuclear aequivalents with the electron microscope by reactions with basic silveroxide solutions on the aldehydes in D.N.A. failed.

No evidence could be found for the existence of a life cycle of the tubercle bacillus. In bacilli from young cultures on solid media transversal fission could be observed. Fission seemed to be induced by a sharp incision in or near the centre of the bacillus.

In impressionprints from many cultures were found besides the bacteria a) free granules, b) amorphous homogeneous masses of cytoplasm with or without granules, c) sporide localisation of granules or dense areas. Evidence that these elements can develop into bacteria never was observed.

Avian tubercle bacilli can grow by budding and branching. All branching filaments from aging cultures had a degenerating cytoplasm or were wholly or partly changed into an empty membrane and were non-acidfast.

The contribution of branching to the multiplication must be doubted. Some long avian bacilli seemed to disintegrate into many

nearly rectangular fragments. Many fragmentated bacilli from aging cultures appeared to be lysed, in other fragmentated bacteria some of the fragments looked like isolated little bacilli. Fragmentated filaments always were found till the end of the observationperiod and at that time they were non-acidfast. After subculturing, all fragmentated bacilli showed lysis. It is possible that this fragmentation points to a series of incomplete fissions.

In suspensions of tissues, from which the tubercle bacilli were removed either by filtration or centrifugation, it was not possible to find filtrable or bigger particles from a life cycle of the tubercle bacillus with the electronmicroscope. From filtered suspensions of cultures or infected tissues (chorioallantoic membranes) no pathogenic elements could be isolated neither by culturing on artificial media nor by injection into guineapigs.

Fractionated centrifugation however turned out to be a nonreliable method for removing tubercle bacilli from suspensions. From suspensions treated after this method, it was frequently possible to isolate tubercle bacilli on artificial media. In the same series of experiments we found

a) 2 times no growth on artificial media while the infected guineapigs showed tuberculous lesions.

b) 4 times no lesions in the guineapigs and no growth on artificial media.

The existence of filterable or non-filterable pathogenic elements which cannot be cultured on artificial media but develop into tubercle bacilli is very doubtful.

- ALEXANDER-JACKSON, E. 1945, Ann. New York Acad. Sci. 46, 127.
 ARLOING, F., DUFOURT, A. 1926, C.R. Soc. Biol. 81, 826.
 ARLOING, F., DUFOURT, A. 1926, *ibid* 95, 1363.
 BALOGH, G., GUBA, F. 1952, Act. Physiol. Acad. Sci. Hung. 3, 465.
 BASSERMANN, F. J. 1955, Beitr. Klin. Tuberk. 113, 134.
 BASSERMANN, F. J. 1954, Ther. Meded. 4, 82.
 BELOZERSKY, A. N. 1947, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 12, 1.
 BISSET, K. A. 1949, J. Gen. Microbiol. 3, 93.
 BISSET, K. A. 1953, *ibid* 8, 50.
 BLOCH, H. 1950, J. Exp. Med. 91, 197.
 BOENTARAN MARTOATMODJO. 1931, Academisch proefschrift, Leiden.
 BOIVIN, A. 1948, C.R. Soc. Biol. 142, 1259.
 BOIVIN, A. 1947, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 12, 7.
 BORRIES, VON B. RUSKA, H. 1939, Naturwiss. 27, 577.
 BRADFIELD, J. R. G. 1954, Nature 173, 184.
 BRETEY, J., IMELIK, S. 1949, Ann Inst. Pasteur 77, 228 en 597.
 BRETSCHNEIDER, L. H. 1949, Proc. Kon. Ned. Acad. Wetensch. 52, 301.
 BRIEGER, E. M., COSSLETT, V. E. 1948, J. Appl. Physics 19, 1188.
 BRIEGER, E. M., COSSLETT, V. E. 1949, Nature 164, 352.
 BRIEGER, E. M., COSSLETT, V. E., GLAUERT, A. M. 1954, J. Gen. Microbiol. 10, 2.
 BRIEGER, E. M., FELL, H. B. 1946, J. Hyg. Cambridge 44, 158 en 256.
 BRIEGER, E. M., GLAUERT, A. M. 1953, Tubercle 34, 128.
 BRIEGER, E. M., GLAUERT, A. M. 1954, *ibid* 35, 80.
 BRIEGER, E. M., MILES, J. A. R., COSSLETT, V. E., HORNE, R. W. 1951, Nature 168, 96.
 BRIEGER, E. M., ROBINOW, C. F. 1947, J. Hyg. Cambridge 45, 413.
 BRINGMANN, G. 1950—51, Zentr.bl. Bakt. 156, 493.
 BIJL, J. P. 1928, Versl. Ned. Tuberculosestudiecomm. No. 2.
 BIJL, J. P. 1928, Bijlage 1 Versl. en meded. Volksgez. No. 10, 1218.
 CALMETTE, A. 1930, Deutsche Med. Wschr. 56, 733, 1930.
 CALMETTE, A., VALTIS, J. 1926, Ann. de Med. 19, 553.
 CALMETTE, A., VALTIS, J., LACOMME, M. 1926, Presse Méd. 34, 1409.
 CASSEL, W. 1950, J. Bact. 59, 185.
 COPPEN-JONES, A. 1895, Centr.bl. Bakt. I 17, 1 en 70.
 COSTIL, L., BLOCH, F. 1938, C.R. Soc. Biol. 128, 40.
 DELAMATER, E. D. 1951, Stain Technol. 26, 199.
 DETTMER, N., SCHWARZ, W. 1954, Z. Wiss. Mikrosk. 61, 423.
 DUBOS, R. J. 1947, „The Bacterial Cell”, Harvard University Press Cambridge Mass.
 DUIJN, VAN, P. 1955, persoonlijke mededeling.
 DUIJN, VAN, P. 1956, J. Histochem. Cytochem. ter perse.
 DUIJN, VAN P., OOSTROM, J., WEHBERG, B. J. 1954, Ned. T. v. Geneesk. 98, 1075.
 ESPERSEN, E. 1949, Acta Path. Microbiol. Scand. 26, 178.
 FITE, G. L., OLSON, B. J. 1944, Publ. Health Rep. 59, 1423.
 FONTÈS. 1926, Centr.bl. Bakt. I Ref. 83, 476.
 FRIEDMANN, I. 1954, Tubercle 26, 75.
 GARDNER, A. D. 1929, J. Path. Bact. 32, 715.
 GOGOLAK, F. M. 1953, J. Inf. Dis., 92, 248.
 GOMORI, G. 1952, „Microscopic Histochemistry”, The University of Chicago Press, Chicago.

- GRASSET, E., BONIFAS, V. 1951, Bull. Ac. Suisse Sci. Méd. 7, 71.
- HAUDUROY, P., TANNER, F. 1954, C.R. Acad. Sci. 238, 1171.
- HAUDUROY, P., VAUDREMER, A. 1923, C.R. Soc. Biol. 89, 1276.
- HILLIER, J. 1950, Ann. Rev. Microbiol. 4, 1.
- HILLIER, J., KNAYSIG, G., BAKER, R. F. 1948, J. Appl. Physics 19, 124.
- HILLIER, J., MUDD, S., SMITH, A. G. 1949, J. Bact. 57, 319.
- HOTCHKISS, R. D. 1948, Arch. Biochem. 16, 131.
- HU, K. 1936, Jap. J. Exp. Med. 14, 29.
- JENSEN, H. L. 1934, Proc. Linn. Soc. New South Wales 59, 19 l.c. McCARTER, J., HASTINGS, E. G.
- KAHN, M. C. 1929, Am. Rev. Tuberc. 20, 150.
- KELLENBERGER, E. 1952, Z. Wiss. Mikrosk. 60, 408.
- KELLENBERGER, E. 1954, Rapp. Europ. Congres. Toegep. Electr. micr.
- KINGMA BOLTJES, T. Y. 1953, in Leerboek der Microbiologie en Immunologie door A. CH. RUYS. N.V. A. Oosthoek's Uitgeversmij. - Utrecht.
- KLIENEBERGER-NOBEL, E. 1951, Bacteriol. Rev. 15, 77.
- KNAYSIG, G., HILLIER, J., FABRICANT, C. 1950, J. Bact. 60, 423.
- KÖLBEL, H. 1951, Z. f. Hyg. 133, 45.
- KÖNIG, H., WINKLER, A. 1948, Naturwiss. 35, 136, 1948.
- LAPORTE, R. 1941, C.R. Acad. Sci. 212, 138.
- LAPORTE, R. 1943, Ann. Inst. Pasteur 69, 262.
- LAPORTE, R., VENDRELY, R. 1945, Bull. Soc. Chim. Biol. 24, 437.
- LEE, VAN DER, J. 1928, Academisch proefschrift, Utrecht 1928.
- LEMBKE, A. 1947, Zentr.bl. Bakt. I Orig. 152, 239.
- LEMBKE, A., RUSKA, H., CHRISTOPHERSEN, J. 1940, Klin. Wschr. 19, 217.
- LEPINE, P. 1955, Presse méd. 63, 199.
- LIE, K. T. 1955, Academisch proefschrift, Leiden.
- LILLIE, R. D. 1947, J. Lab. Clin. Med. 32, 76.
- LILLIE, R. D. 1954, „Histopathologic Technic and Practical Histochemistry”. The Blakiston Company Inc. New York Toronto.
- LUBARSCH, O. 1899, Z. Hyg. Inf.kr. 31, 187.
- MALASSEZ, L., VIGNAL, W. 1883, Arc.. Physiol. Norm. Path. 4, 81.
- MALEK, I., STERZL, J. 1948, C.R. Soc. Biol. 142, 1053.
- MALEFATTI, M. 1949, Rev. Asoc. Med. Argent. 113, 435.
- McCARTER, J., HASTINGS, E. G. 1935, J. Bact. 29, 503.
- McCLUNG, N. M. 1950, J. Bact. 59, 589.
- McMANUS, J. F. A. 1946, Nature 158, 282.
- McMANUS, J. F. A., CASON, J. E. 1950, J. Exp. Med. 91, 651.
- METSCHNIKOFF, E. 1888, Arch. Path. Anat. Phys. (Virchow) 113, 63.
- MÖLLER, V., BIRCH-ANDERSEN, A. 1951, Acta Path. Microbiol. Scand. 29, 132.
- MORTISCHNIG, E., RUZICZKA, O. 1949, Oesterr. Z. Kinderheilk. 3, 240.
- MUCH, H. 1908, Münch. med. Wschr. 55, 1103.
- MUDD, S., POLEVITSKY, K., ANDERSON, TH. F. 1942, Arch. Path. 34, 199.
- MUDD, S., SMITH, A., HILLIER, J., BEUTNER, E. H. 1950, J. Bact. 60, 635.
- MUDD, S., WINTERSCHIED, L. C. 1953, Exp. Cell Research 5, 251.
- MUDD, S., WINTERSCHIED, L. C., DELAMATER, E. D., HENDERSON, H. J. 1951, J. Bact. 62, 459.
- NEDELKOVITSCH, J. 1950, Ann. Inst. Pasteur 78, 177.
- NÈGRE, L., BRETEY, J. A. 1953, Am. Rev. Tuberc. 68, 467.
- NOCARD en ROUX 1887, Ann. Inst. Pasteur 1, 19.
- OERSKOV, J. 1932, Zentr.bl. Bakt. I Orig. 123, 271.
- OOMEN, A. J. B. 1932, Academisch Proefschrift Utrecht.
- PENSO, G., ORTALI, V., GAUDIANO, A., PRINCIVALLE, M., VELLA, L., ZAMPIERI, A. 1951, Rend. Ist. Sup. Sanita 14, 855.
- PIEKARSKI, G. 1937, Arch. Mikrobiol. 8, 428.

- REED, C. I., ROSENTHAL, S. R., REED, B. P. 1948, *Ann. Inst. Pasteur* 75, 504.
 ROBINOW, C. F. 1947, Addendum to DUBOS' „The Bacterial Cell”.
 ROBINOW, C. F., COSSLETT, V. E. 1948, *J. Appl. Physics*.
 ROSENBLATT, M. B., FULLAM, E. E., GESSLER, A. E. 1942, *Am. Rev. Tuberc.* 46, 587.
 ROSENTHAL, S. R., HEAGAN, B. 1955, *Ann. Inst. Pasteur* 88, 479.
 ROTH, W. 1949, *Schweiz. Z. Path. Bakt.* 12, 451.
 RUSKA, H., BRINGMANN, G., NECKEL, I., SCHUSTER, G. 1952, *Z. Wiss. Mikrosk.* 60, 425.
 RUYS, A. CH. 1928, *Ned. T. v. Geneesk.* 795.
 RUZICZKA, O. 1951, *M Schr. Kinderheilk.* 99, 22.
 RUZICZKA, O., ORTH, E. 1950, *Wiener Med. Wschr.* 100, 95.
 SALL, T., DAVIS, J. C., MUDD, S. 1955, *J. Histochem. Cytochem.* 3, 384.
 SCHLEMPER, P., TEN THIJE, J. H. 1939, *Meded. Prof. de Jongstichting* No. 3.
 SKINNER, C. E., EMMONS, C. W., TSUCHIYA, H. M. 1947, HENRICI's „Molds, yeasts and Actinomycetes”, Wiley and Sons Inc. New York.
 SMITH, A. G. 1950, *J. Bact.* 59, 575.
 STACEY, M. 1947, „Nucleic Acid” I S.E.B. Symp. Cambridge University Press, blz. 86.
 TROCH, P. 1943, *Z. Hyg. Inf. kr.* 124, 513.
 TRONNIER, E. A. 1952—53, *Zentr.bl. Bakt. I Orig.* 159, 213.
 TULASNE, R. 1949, *C.R. Soc. Biol.* 143, 1390 en 1392.
 VALENTINE, R. C., BRADFIELD, J. R. G. 1954, *J. Gen. Microbiol.* 7, 349.
 VALTIS, J. 1924, *C.R. Soc. Biol.* 90, 19 en 74.
 VALTIS, J., VAN DEINSE, F. 1932, *C.R. Soc. Biol.* 111, 371.
 VAUDREMER, A. 1923, *C.R., Soc. Biol.* 89, 80.
 VERA, H. D., RETTGER, L. F. 1940, *J. Bact.* 39, 659.
 WELSCH, M., NIHOUL, E. 1948, *C.R. Soc. Biol.* 142, 1449.
 WERNER, G. H. 1951, *Adv. Tuberc. Research* 4, 53.
 WERNER, G. H. 1954, *Am. Rev. Tuberc.* 69, 473.
 WESSEL, E. 1942, *Z. Tuberk.* 88, 22.
 WINTERSCHIED, L. C., MUDD, S. 1953, *Am. Rev. Tuberc.* 67, 59.
 WYCKOFF, R. W. G. 1934, *J. Exp. Med.* 59, 381.
 WYCKOFF, R. W. G., SMITHBURN, K. C. 1933, *J. Inf. Dis.* 53, 201.
 XALABARDER, C. 1953, *Publ. Inst. Antitub. Francisco Moragas* 10, 7.
 XALABARDER, C. 1954, „El Origen del Bacilo de Koch” *Publ. Inst. Antitub. Francisco Moragas*.
 YEGIAN, D., KURUNG, J. 1947, *Am. Rev. Tuberc.* 56, 36, 1.
 YEGIAN, D., PORTER, K. R. 1944, *J. Bact.* 48, 83.

AFBEELDINGEN

